

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

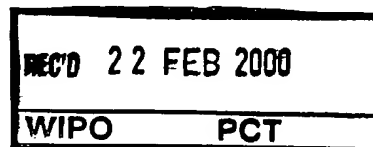
ST/US 99/25955
BOJUS 07 JAN 2000

ROYAUME DE BELGIQUE

MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES
ADMINISTRATION DE LA POLITIQUE COMMERCIALE



Il est certifié que les annexes à la présente sont la copie fidèle de documents accompagnant une demande de brevet d'invention tels que déposée en Belgique suivant les mentions figurant au procès-verbal de dépôt ci-joint.

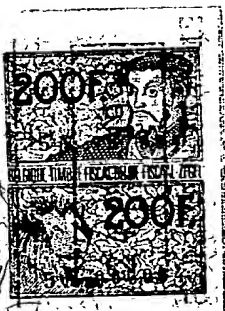


Bruxelles, le 24.-12-1999

Pour le Conseiller de l'Office
de la Propriété industrielle

Le fonctionnaire délégué,

BAILLEUX G.
Conseiller adjoint



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PROCES-VERBAL DE DEPOT
D'UNE DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

Nr : 09800796

Aujourd'hui, le -4-11-1998 à 15 heures, 20 minutes,

M HOSTE

agissant en tant que ☐ Demandeur.
☐ Employé du demandeur.
☐ Employé d'un établissement effectif du demandeur.
☐ Mandataire agréé.
☒ Employé du mandataire agréé, M Powis de Tenbossche Roland
☐ Avocat.

se présente à l'OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE et y dépose une demande en vue d'obtenir un brevet d'invention relatif à ELEMENT MUNI D'UNE COUCHE DE FIBRINE, SA PREPARATION ET SON UTILISATION.

demandé par BAXTER INTERNATIONAL INC.

One Baxter Parkway

Deerfield, Illinois 60015-4633

Etats-Unis d'Amérique

La demande, telle que déposée, contient les documents nécessaires pour obtenir une date de dépôt conformément à l'article 16, paragraphe 1er, de la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention.

Le déposant,

Le fonctionnaire délégué,

SCHIETTECATTE W.
Conseiller adjoint

Bruxelles, le -4-11-1998

Élément muni d'une couche de fibrine, sa préparation et son utilisation

La présente invention a pour objet un élément présentant une couche à base de fibrine, ledit élément comportant (a) un support hydrophobe ou sensiblement hydrophobe présentant une partie poreuse dont l'épaisseur est comprise entre 0,1 et 5 mm et dont les pores s'étendant au travers de son épaisseur ont un espace internodal compris entre 5 et 100 μ m, une face de ladite partie poreuse dudit support étant traitée au moyen d'une composition à base de fibrine et/ou de fibrinogène, et (b) une couche à base de fibrine recouvrant ladite face traitée du support.

On connaît de tels éléments par le document WO 96/07444 et par le document US 5298255. Ces éléments connus sont préparé par simple immersion d'un support dans une solution contenant du fibrinogène et de la thrombine ou en poussant une telle solution sur un support poreux. Ces éléments connus présentent une couche de fibrine sensiblement compacte et ne présentent que peu, voire pas de fibrine située dans les pores du support dans le cas d'une simple immersion ou présentent de la fibrine dans les pores de plus grand diamètre et sensiblement pas de fibrine dans les pores de petits diamètre due à un passage préférentiel de fibrine par les pores de plus grand diamètre. Ce passage préférentiel de fibrine par les pores de plus grand diamètre sera une cause d'un manque d'homogénéité et ou d'uniformité.

Ce manque d'homogénéité ou d'uniformité quant à la présence de fibrine dans les pores du support s'est révélé dans des cas être préjudiciable à l'attachement des cellules.

La présente invention vise à remédier à ces inconvénients et a essentiellement pour objet un élément du type décrit dans le premier paragraphe du présent mémoire, cet élément étant caractérisé en ce que ladite couche à base de fibrine est sensiblement uniforme et homogène sur ladite face traitée. La couche de fibrine selon l'invention se caractérise par la non présence de fibrinogène non

lié à la couche de fibrine. La non présence de fibrinogène dans la couche de fibrine peut être détecté par l'absence de la bande γ du diagramme d'électrophorèse. La non présence de fibrinogène dans la couche de fibrine est due au fait que tout fibrinogène n'ayant pas réagi pour former le réseau de fibrine est aspiré à travers le support poreux. Ainsi, l'élément suivant

5 l'invention se caractérise par le fait qu'au niveau du contact entre la couche de fibrine et le support, il n'y a sensiblement pas, de préférence pas de fibrinogène n'ayant pas réagi. Par exemple, la couche de fibrine de l'élément suivant l'invention contient moins de 2% en poids de fibrinogène n'ayant pas réagi pour

10 former un réseau de fibrine, de préférence moins de 1%, en particulier moins de 0,5% et plus particulièrement moins de 0,1%.

De façon avantageuse, la couche de fibrine et au moins la couche du support s'étendant sur une épaisseur de 10 μ m contient moins de 1% en poids,

15 avantageusement moins de 0,5 %, de préférence moins de 0,1% en poids de fibrinogène n'ayant pas réagi par rapport au poids de la couche de fibrine. De préférence, de la fibrine s'étend dans l'épaisseur de la partie poreuse traitée du support, à partir de ladite face traitée sur une profondeur d'au moins 2 μ m, à la fois dans les pores de diamètre moyen compris entre 10 et 20 μ m et dans les

20 pores de diamètre moyen supérieur à 20 μ m.

Selon une forme de réalisation particulière, dans lequel la partie poreuse du support présente une porosité sensiblement homogène et uniforme sur sa face traitée, de manière homogène et uniforme de la fibrine s'étend dans l'épaisseur de la partie poreuse du support sur une profondeur d'au moins 10 μ m.

25 Selon une forme de réalisation possible, le support poreux contient du fibrinogène dans une couche distante de plus de 10 μ m de la face en contact avec la couche de fibrine, en particulier sur une profondeur d'au moins 20 μ m.

La présence de fibrinogène libre (n'ayant pas encore réagi) est de préférence à

30 éviter une fois que le réseau de fibrine est formé, pour éviter que lors du remouillage de la couche de fibrine séchée, de nouvelles liaisons de fibrine se

forment dans le réseau, de telle liaisons réduisant alors la tailles des alvéoles ou de certaines alvéoles du réseau.

Selon une forme de réalisation suivant l'invention, de la fibrine attachée au
5 réseau s'étend dans l'épaisseur de la partie poreuse traitée du support, à partir
de ladite face traitée sur une profondeur d'au moins 2 μm à la fois dans les
pores de diamètre moyen compris entre 10 et 20 μm et dans les pores de
diamètre moyen supérieur à 20 μm . Bien que le support puissent être réalisé en
toute matière hydrophobe ou sensiblement hydrophobe, il est en particulier
10 réalisé en polyéthylène, en polyéthylène téréphthalate ou en
polytétrafluoroéthylène, lesdits matériaux étant avantageusement soumis à un
étirage, en particulier à un étirage biaxial.

Par matériau hydrophobe ou sensiblement hydrophobe, on entend en particulier
15 les matériaux présentant un angle compris entre 30 et 50°, angle mesuré selon
la méthode ASTM D 2578-84.

De façon avantageuse, la partie poreuse du support présente une porosité
sensiblement homogène et uniforme sur sa face traitée, c'est-à-dire que la
20 répartition des pores ou le nombre de pores par unité de surface est
sensiblement uniforme pour la partie poreuse. Par exemple, pour une partie
poreuse donnée, le volume des pores de diamètre supérieur à 10 μm d'une zone
de 1 cm^2 de la partie poreuse variera entre 0,8 et 1,2, de préférence entre 0,9 et
1,1, fois le volume moyen de pores de diamètre supérieur à 10 μm par cm^2 de
25 la partie poreuse .

Selon une forme de réalisation, au moins la face de la couche de fibrine
opposée à celle touchant le support poreux est stabilisée. En particulier, ladite
couche à base de fibrine est au moins partiellement réticulée pour former un
30 réseau d'alvéoles adjacentes et présentant des ouvertures entre elles. La couche
subit avantageusement une réticulation suffisante pour que la couche ne soit
pas soluble dans l'eau.

Selon un détail d'une forme de réalisation avantageuse, ladite couche est munie de cellules et/ou de protéines, en particulier de protéines favorisant la liaison cellules-fibrine, de fibronectine, etc.

5

Bien que des épaisseurs de couche de fibrine sous forme hydratée ou après réhydratation supérieures à 100 μ m, voire supérieures à 500 μ m sont possibles, selon une caractéristique d'une forme de réalisation préférée, la couche à base de fibrine réticulée (sous forme hydratée ou après réhydratation) couvrant la
10 partie poreuse du support a une épaisseur comprise entre 0,5 et 100 μ m, avantageusement de 2,5 à 50 μ m, de préférence entre 5 et 20 μ m, des alvéoles étant formées entre les molécules ou liens à base de fibrine réticulées, lesdites alvéoles présentant un volume compris entre 5 et 25 μ m³, l'épaisseur ou la hauteur moyenne de ladite chambre étant comprise entre 1 et 5 μ m, en
15 particulier entre 1 et 3 μ m.

Selon un détail d'une forme de réalisation particulière, les pores de la partie du support recouvert de ladite couche de fibrine présentent des faces internes au moins partiellement recouvertes d'une protéine soluble dans l'eau ou
20 sensiblement soluble dans l'eau. Par exemple, les pores de la partie du support recouvert de ladite couche de fibrine sont partiellement recouverts de fibrinogène, d'albumine, de fibronectine, de vibronectine ou d'un mélange de ceux-ci. En particulier, la face du support opposée à la face traitée est recouverte au moins partiellement d'une protéine soluble dans l'eau ou
25 sensiblement soluble dans l'eau. Un tel recouvrement est avantageux pour faciliter l'adhésion des tissus en contact avec la face opposée à la face du support traitée.

Selon une caractéristique avantageuse, au moins les pores de la partie poreuse
30 du support sont au moins partiellement recouverts par un adjuvant polaire soluble ou miscible dans l'eau. Un tel adjuvant est de préférence non dénaturant pour les structures protéiniques et biocompatibles. A titre

d'adjuvant, on peut citer le glycérol, les sucres (sucrose, mannitol, sorbitol, etc.)
Lesdits adjuvants sont en particulier solubles ou au moins miscibles dans l'eau
et sont en particulier choisis parmi les adjuvants solubles ou miscibles dans
l'eau qui permettent d'abaisser la température de congélation par rapport à la
5 température de congélation de l'eau à pression atmosphérique.

Selon une forme préférée, l'élément se présente sous une forme sèche, par
exemple sous une forme présentant une teneur en humidité de moins de 0,5%
en poids, voire de moins de 0,1% en poids.

10

Selon une forme de réalisation avantageuse, la couche de fibrine est réticulée
en présence de fibronectine. La teneur en fibronectine réticulée dans la couche
de fibrine est avantageusement comprise entre 0,5 et 15%, de préférence de 1 à
10%, du poids de fibrine et de fibronectine de la couche réticulée. Cette teneur
15 correspond au poids des liaisons fibronectine dans la couche par rapport au
poids des liaisons de fibrine et de fibronectine de la couche.

Selon un détail d'une forme de réalisation avantageuse, la couche de fibrine
contient du calcium, en particulier du calcium et du chlore, et de façon plus
20 précise du chlorure de calcium. La teneur en calcium de la couche de fibrine
exprimée sous forme de μg de calcium par unité de volume de la couche de
fibrine (cm^3) est avantageusement comprise entre 1 et $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$, de
préférence entre 5 et $90\mu\text{g}/\text{cm}^3$, en particulier de 10 à $50\mu\text{g}/\text{cm}^3$. La teneur en
chlore de la couche de fibrine est avantageusement comprise entre 1,5 et
25 $200\mu\text{g}/\text{cm}^3$, de préférence entre 8 et $170\mu\text{g}/\text{cm}^3$, en particulier entre 16 et
 $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Lorsque le calcium se présente sous forme de chlorure de calcium,
la teneur en chlorure de calcium de la couche de fibrine (exprimée sous forme
de μg de chlorure de calcium par unité de volume (cm^3) de la couche de
fibrine) est avantageusement comprise entre 2,5 et $300\mu\text{g}/\text{cm}^3$, de préférence
30 entre 13 et $260\mu\text{g}/\text{cm}^3$, en particulier de 26 à $150\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

De façon avantageuse, la couche de fibrine ne contient sensiblement pas
d'autres sels de métaux alcalins ou alcalino-terreux que le chlorure de calcium.

De préférence, la teneur en sels de métaux alcalins ou alcalino-terreux autres que le chlorure de calcium, dans la couche de fibrine est au moins 10 fois, de préférence au moins 20 fois, en particulier au moins 50 fois inférieure à celle de chlorure de calcium dans la couche de fibrine.

5

Bien que le support puisse être un support poreux quelconque, le support de l'élément est de préférence un support bio-compatible et/ou biodégradable.

10 Selon un détail particulier d'une forme de réalisation de l'élément suivant l'invention, l'élément comporte deux ou plus de deux couches superposées de fibrine. De façon avantageuse, les couches présentent des alvéoles de volume moyen différent. En particulier, la couche de fibrine recouvrant la couche de fibrine en contact avec le support poreux présente des alvéoles de volume
15 moyen inférieur au volume moyen des alvéoles de la couche de fibrine en contact avec le support poreux. Par exemple, le volume moyen des alvéoles de la couche de fibrine recouvrant la couche de fibrine en contact avec le support est inférieur à environ 0,5 fois le volume moyen des alvéoles de la couche de fibrine en contact avec le support. Selon une forme de réalisation, la couche de fibrine recouvrant la couche de fibrine en contact avec le support pénètre
20 partiellement dans ladite couche de fibrine en contact avec le support. La pénétration de la couche de fibrine avec de petites alvéoles dans la couche de fibrine avec de grandes alvéoles est avantageusement telle que la couche de fibrine avec de petites alvéoles pénètrent au moins dans 50% de l'épaisseur de la couche de fibrine avec de grandes alvéoles, mais de préférence sur moins de
25 la totalité de ladite épaisseur.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un élément suivant l'invention. Dans ce procédé,

30 - on met au moins une partie poreuse d'une première face d'un support poreux en contact avec une solution aqueuse contenant de la fibrine ou du fibrinogène ou un ou des composés à base de fibrine ou contenant du fibrinogène,

- on soumet, de manière sensiblement homogène et uniforme, la face de la partie poreuse du support opposée à ladite première face, à un effort d'aspiration d'au moins une partie de la solution au travers de ladite partie poreuse, assurant, de manière homogène et uniforme par rapport à ladite partie poreuse, un dépôt d'une couche à base de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène et une diffusion au moins d'eau de la solution à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support poreux et une pénétration de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène dans le support poreux. Une telle aspiration permet d'obtenir une couche de fibrine sensiblement exempte de fibrinogène, en particulier si on a soumis la couche de fibrine à un lavage au moyen d'eau ou d'une solution aqueuse.

Le procédé suivant l'invention permet d'obtenir un élément suivant l'invention tel que décrit plus haut.

Du fait de l'aspiration de la fibrine attachée au réseau est apte à pénétrer dans le support poreux sur une profondeur d'au moins $2\text{ }\mu\text{m}$, à la fois dans les pores de diamètre moyen compris entre 10 et $20\text{ }\mu\text{m}$ et dans les pores de diamètre moyen supérieur à $20\text{ }\mu\text{m}$.

De façon avantageuse, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$ et on crée entre les deux faces de la partie poreuse une différence de pression d'au moins $0,3\text{ }10^5\text{ Pa}$. De préférence, on soumet la face du support opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,5\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure ou égale à environ $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$. Selon une forme préférée assurant un bon passage de fibrine ou de fibrinogène à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support, on soumet la face du support opposée à la première face de manière intermittente à une première pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure à environ $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$, et à une deuxième pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure à $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$, la première pression étant au moins 5% supérieure à la deuxième pression. Au lieu de faire varier la pression ou dépression exercée

sur la face opposée à ladite première face, il aurait été possible de faire varier légèrement la pression exercée sur ladite première face.

5 De façon avantageuse, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa et à une température comprise entre 0 et 100°C, de préférence à une température comprise entre 15 et 60°C, en particulier à une température comprise entre 25 et 40°C.

10 Selon une variante d'un procédé suivant l'invention, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première partie à une solution choisie pour créer un phénomène d'osmose inverse induisant une diffusion au moins d'eau de la solution en contact avec la première face à travers la partie poreuse du support. Une telle diffusion assurant ainsi un passage sensiblement uniforme et régulier de fibrine ou de fibrinogène au moins partiellement à travers
15 l'épaisseur du support poreux.

Pour la mise en oeuvre du procédé suivant l'invention, on utilise avantageusement une solution contenant de 5 à 20 mg/ml de matières contenant du fibrinogène, en particulier une solution contenant de 5 à 20 mg/ml de
20 matières contenant du fibrinogène et de 0,01 à 10 unités de thrombine par ml, de préférence une solution contenant de 5 à 20 mg/ml de matières contenant du fibrinogène, du facteur XIII et de 0,01 à 2, de préférence de 0,05 à 1 unités de thrombine par ml. Selon une forme de réalisation avantageuse, la solution contient moins de 0,5 unité de thrombine par ml.

25 On a également remarqué qu'il était avantageux que la solution contienne de 0,1 à 10 unités de Facteur XIII par ml. Il s'est également avéré avantageux que la solution contienne de 1 à 40 millimole de CaCl_2 par ml, en particulier de 1 à 20 millimole de CaCl_2 par ml pour diminuer ou ralentir la fibrinolyse. Ainsi,
30 par exemple pour une couche de fibrine préparée en présence de 20 millimole de CaCl_2 par ml, aucune fibrinolyse ne pouvait être détectée visuellement une semaine après la préparation de la couche de fibrine.

On notera que plus la quantité de thrombine utilisée est faible lors de la formation du réseau de fibrine, plus grande sera la quantité de fibrinogène apte à pénétrer dans le support poreux. Malgré ce fait, le procédé suivant l'invention
5 permet d'obtenir une couche de fibrine sensiblement exempte de fibrinogène, en particulier au niveau de la face du support en contact avec la couche de fibrine.

Selon une caractéristique d'un procédé suivant l'invention, dans une première
10 étape on met au moins une partie d'une première face d'un support poreux en contact avec une solution contenant de la fibrine et/ou des matières contenant du fibrinogène, dans laquelle on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face, à un effort d'aspiration pour assurer, de manière homogène et uniforme par rapport à ladite partie poreuse de la première face,
15 une diffusion au moins d'eau de la solution à travers l'épaisseur du support poreux et une pénétration de fibrine et/ou de matières contenant du fibrinogène dans l'épaisseur du support poreux sur une profondeur d'au moins 2 μm , et dans une seconde étape on soumet la couche de fibrine et/ou de fibrinogène à une stabilisation.

20 Selon une forme de réalisation possible, on assure un contact de ladite partie de la première face avec une solution aqueuse en mouvement.

De façon avantageuse la solution contenant de la fibrine ou des matières
25 contenant du fibrinogène contient également un adjuvant organique polaire. L'utilisation d'un tel adjuvant organique polaire s'est avérée permettre un contrôle de l'épaisseur des fibres du réseau de fibrine. De plus, la présence d'un tel adjuvant organique s'est également avérée avantageuse pour protéger la couche à base de fibrine lors d'une étape de séchage, éventuellement après une
30 étape de lavage. L'opération de séchage est avantageusement opérée au moins partiellement par lyophilisation, de façon avantageuse à une température comprise entre -30°C et -100°C , de préférence à une température entre -40°C

et -70°C . Par exemple, le séchage se fait en plusieurs étapes, à savoir une première étape de séchage par élévation de la température (par exemple à une température comprise entre 30 et 70°C) ou par mise sous vide après avoir retiré la solution de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène en contact avec
5 la partie poreuse du support, et une deuxième étape de séchage par lyophilisation.

Les opérations de séchage sont avantageusement effectuées après une ou plusieurs étapes de lavage au moyen d'eau, d'une solution aqueuse, par exemple
10 d'une solution aqueuse contenant un adjuvant organique polaire (par exemple à raison de 1 à 20% en poids, en particulier à raison de 5 à 10% en poids), tel que de la glycérine. Une opération de lavage particulière consiste à mettre la couche de fibrine solidaire du support poreux en contact avec une solution aqueuse, en particulier une solution contenant du glycérol (par exemple de 1 à
15 20% en poids, en particulier de 5 à 10% en poids) et à soumettre ensuite l'autre face du support à un effort d'aspiration de la solution au travers du support poreux. Un tel lavage permet d'obtenir un support poreux exempt de fibrinogène. Une telle opération de lavage peut être appliquée sur des supports munis d'une couche de fibrine non selon l'invention et permet donc de
20 transformer un produit obtenu par simple contact du support poreux avec la solution contenant du fibrinogène en un élément suivant l'invention.

La solution de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène utilisé dans le procédé de formation de la couche de fibrine suivant l'invention contient de
25 préférence de 0 à 20% , en particulier de 3 à 15% , et plus particulièrement de 5 à 10% dudit adjuvant organique polaire. Un tel adjuvant est avantageusement du glycerol, un sucre (mannitol, sorbitol, sucrose, glucose, etc). Lors de l'utilisation d'une solution contenant des matières contenant du fibrinogène à raison de 5 à 20 mg/ml , de la thrombine à raison de $0,01$ à 10 unités par ml e'
30 de 5 à 10% de glycérol dans le procédé suivant l'invention, on a remarqué r était possible d'obtenir un réseau de fibres de fibrine dont la taille des alv était similaire à celle des alvéoles du réseau obtenue à partir d'une solu'

contenant des matières contenant du fibrinogène à raison de 5 à 20 mg/ml et de la thrombine à raison de 0,01 à 10 unités par ml (sans glycérol) dans le procédé suivant l'invention. Toutefois, la taille des fibres du réseau obtenu en présence de glycérol était plus faible, de sorte que l'utilisation de la fibrine ou des
5 matières contenant du fibrinogène de la solution était meilleure en présence de glycérol.

Le pH de la solution de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène est avantageusement compris entre 5 et 8,5, de préférence entre 5,5 et 8, et en
10 particulier entre 6 et 7,5. Le pH de la solution peut être contrôlé au moyen d'un tampon ou d'une solution tampon (par exemple Tris), par l'ajout d'un acide fort (HCl) ou faible, minéral ou organique (acide citrique, etc.).

La solution contient également avantageusement au moins une protéine soluble
15 dans l'eau, en particulier de l'albumine.

Selon une forme de réalisation particulière, au moins pour une partie du dépôt de la couche à base de fibrine ou de composés fibrinogènes, on contrôle la concentration en fibrine ou de composés fibrinogènes de la solution en contact
20 avec la première face pour assurer une diffusion sensiblement constante d'eau au travers du support.

Dans le procédé suivant l'invention, on utilise avantageusement un support poreux bio compatible ou bio dégradable.
25

Selon une forme de réalisation particulière, mais qui présente des avantages pour assurer dès le départ une diffusion sensiblement uniforme d'eau à travers l'épaisseur du support poreux, on traite la partie poreuse au moyen d'une solution aqueuse contenant avantageusement un agent de mouillage et/ou une
30 protéine soluble dans l'eau et/ou un adjuvant organique polaire, avant de mettre la solution contenant de la fibrine et/ou du fibrinogène en contact avec ladite partie poreuse.

- Selon l'invention, il est également possible de traiter successivement le support poreux au moyen de solution contenant de la fibrine ou des matières contenant du fibrinogène pour déposer des couches successives de fibrine. Selon
- 5 l'invention il est également possible de traiter le support poreux avec une solution contenant de la fibrine ou des matières contenant du fibrinogène mais ne contenant pas de thrombine, et ensuite de traiter le support prétraité au moyen d'une solution contenant de la thrombine.
- 10 L'invention a encore pour objet un filtre comprenant une membrane filtrante constituée d'un élément suivant l'invention, un bioréacteur comprenant une membrane constitué d'un élément suivant l'invention, un implant constitué d'un élément suivant l'invention, et une peau artificielle constituée à partir d'un élément suivant l'invention.
- 15 Etant donné que la présence du glycérol dans un réseau de fibrine s'est avérée utile pour le contrôle de la taille des alvéoles, pour une meilleure utilisation de la fibrine (fibre de moindre épaisseur) et pour assurer une meilleure viabilité des cellules attachées sur le réseau de fibrine, un autre objet de l'invention est
- 20 une composition à base de fibrine ou de matière contenant du fibrinogène, ladite composition se présentant sous la forme d'une mousse sèche ou de particules de mousse sèches contenant de 0,05 à 10% en poids d'un adjuvant organique polaire soluble dans l'eau ou miscible dans l'eau, ladite mousse présentant une porosité constituée au moins à 50% en volume de chambres ou
- 25 creux de volume compris entre 5 et $25\mu\text{m}^2$. De façon avantageuse, au moins 90% en poids de la fibrine se trouve sous forme réticulée. Eventuellement, la composition contient en outre une ou des protéines et/ou une ou plusieurs substances actives. En tant qu'adjuvant polaire, la glycérine est préférée, mais d'autres adjuvants sont possibles, tels que des sucres, sucrose, glucose,
- 30 mannitol, etc. La teneur en eau est avantageusement inférieure à 0,5% en poids. En fait, la mousse ou réseau de fibrine réticulée est recouverte au moins partiellement par un adjuvant polaire organique soluble ou miscible dans l'eau.

La préparation d'une telle composition peut être obtenue par un procédé dans lequel, éventuellement après une étape de pré-séchage, on sèche par lyophilisation une solution aqueuse de fibrine et/ou de fibrinogène contenant en outre un solvant organique polaire soluble dans l'eau ou miscible dans l'eau, la
5 teneur en solvant organique de ladite solution étant comprise entre 0,05 et 10% en poids, pour obtenir une composition contenant moins de 0,5% en poids. De façon avantageuse, on opère le séchage par lyophilisation à une température comprise entre -40 et -100°C , de préférence entre -50°C et -75°C . En particulier, on effectue la lyophilisation en au moins trois étapes, chaque étape
10 comprenant l'abaissement de la température de la composition ou solution à une température comprise entre -40 et -100°C suivi d'un abaissement de la pression à moins de 0,4 bar ($0,4 \cdot 10^5$ Pa). Par exemple, dans une première étape, on abaisse la pression à une pression comprise entre 0,2 et $0,4 \cdot 10^5$ Pa, et en ce que dans la dernière étape on abaisse la pression
15 à une pression à moins de $0,2 \cdot 10^5$ Pa.

L'invention a également pour objet un procédé permettant de retirer le fibrinogène non lié au réseau de fibrine, et en particulier le fibrinogène présent dans le support poreux, de manière à obtenir une couche de fibrine exempte de
20 fibrinogène, et en particulier un support poreux et une couche de fibrine exempts de fibrinogène. Dans ce procédé,
- on met au moins une partie de la couche de fibrine attachée sur une première face du support poreux en contact avec une solution aqueuse contenant avantageusement un adjuvant polaire organique, et
25 - on soumet, de manière sensiblement homogène et uniforme, la face du support poreux opposée à ladite première face, à un effort d'aspiration d'au moins une partie de la solution au travers de ladite partie poreuse, assurant, de manière homogène et uniforme par rapport à ladite partie poreuse, une élimination de fibrinogène présent dans la couche de fibrine, en particulier au
30 voisinage de ladite première face du support. Grâce à cette aspiration, une diffusion au moins d'eau de la solution à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support poreux a lieu. Au cas où le procédé est appliqué suffisamment

longtemps, la quantité d'eau diffusant au travers de l'épaisseur de la partie poreuse peut être suffisante pour retirer ou éliminer le fibrinogène présent dans les pores du support poreux. Une telle aspiration permet donc d'obtenir une couche de fibrine sensiblement exempte de fibrinogène, voire un support poreux et une couche de fibrine exempte de fibrinogène.

Ce procédé de lavage, lorsqu'on utilise une solution aqueuse contenant un ou des additifs, comme par exemple une ou des protéines solubles, un ou des médicaments, etc. il est possible d'introduire dans le support poreux une quantité dudit ou desdits additifs, voire de recouvrir la face du support non en contact avec la couche de fibrine du ou desdits additifs.

Du fait de l'aspiration de la solution, de l'eau est apte à pénétrer dans le support poreux, de sorte que par exemple sur une profondeur d'au moins $2\text{ }\mu\text{m}$ à partir de la première face (face portant la couche de fibrine), avantageusement d'au moins $10\text{ }\mu\text{m}$, de préférence d'au moins $20\text{ }\mu\text{m}$, au moins les pores de diamètre moyen compris entre 10 et $20\text{ }\mu\text{m}$ soient exempts de fibrinogène.

De façon avantageuse, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$ et on crée entre les deux faces de la partie poreuse une différence de pression d'au moins $0,3\text{ }10^5\text{ Pa}$. De préférence, on soumet la face du support opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,5\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure ou égale à environ $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$. Selon une forme préférée assurant un bon passage d'eau à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support, on soumet la face du support opposée à la première face de manière intermittente à une première pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure à environ $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$, et à une deuxième pression inférieure à $0,8\text{ }10^5\text{ Pa}$, de préférence inférieure à $0,4\text{ }10^5\text{ Pa}$, la première pression étant au moins 5% supérieure à la deuxième pression. Au lieu de faire varier la pression ou dépression exercée sur la face opposée à ladite première face, il aurait été possible de faire varier légèrement la pression exercée sur ladite première face.

De façon avantageuse, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa et à une température comprise entre 0 et 100°C, de préférence à une température comprise entre 15
5 et 60°C, en particulier à une température comprise entre 25 et 40°C.

Selon une variante d'un procédé suivant l'invention, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face portant la couche de fibrine à une solution choisie pour créer un phénomène d'osmose inverse induisant une
10 diffusion au moins d'eau de la solution en contact avec la première face à travers la partie poreuse du support. Une telle diffusion assurant ainsi un passage sensiblement uniforme et régulier d'eau au moins partiellement à travers l'épaisseur du support poreux.

15 Toujours un autre objet de l'invention est un procédé pour préparer des supports poreux recouverts d'une couche d'une matière bio - absorbable ou d'un polymère absorbable, en particulier de polymère polylactique et/ou de polymères polyglycolique et/ou de biopolymères tels que les protéines structurelles et les polysaccharides, les protéines structurelles étant en particulier
20 choisies parmi le groupe comprenant le collagène, l'élastine, la fibronectine, le laminine et la fibrine, ainsi que les autres protéines constitutives du tissu humain ou animal, ainsi que les protéines recombinants. Dans ce procédé, on prépare une solution ou suspension aqueuse contenant un ou des polymères et/ou biopolymères et/ou des matières pour former in situ lesdits polymères
25 et/ou bio polymères. On met en contact la solution ou suspension avec une première face d'un support poreux et on aspire par au moins une autre face du support poreux (avantageusement la face opposée à la première face) au moins une partie de l'eau de ladite solution ou suspension. Cet effort d'aspiration crée une diffusion d'eau et avantageusement de bio polymères ou de polymères
30 absorbables dans le support poreux. Pour assurer cette diffusion, avantageusement, on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face (face en contact avec la solution ou suspension) à une pression

inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa et on crée entre les deux faces de la partie poreuse une différence de pression d'au moins $0,3 \cdot 10^5$ Pa. De préférence, on soumet la face du support opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,5 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure ou égale à environ $0,4 \cdot 10^5$ Pa. Selon une forme
5 préférée assurant un bon passage d'eau à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support, on soumet la face du support opposée à la première face de manière intermittente à une première pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure à environ $0,4 \cdot 10^5$ Pa, et à une deuxième pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure à $0,4 \cdot 10^5$ Pa, la première pression étant au
10 moins 5% supérieure à la deuxième pression. Au lieu de faire varier la pression ou dépression exercée sur la face opposée à ladite première face, il aurait été possible de faire varier légèrement la pression exercée sur ladite première face. On aurait également pu soumettre ladite face opposée à la face en contact avec la solution ou suspension de polymères, à l'influence d'une solution choisie
15 pour créer un phénomène d'osmose inverse induisant une diffusion au moins d'eau de la solution en contact avec la première face à travers la partie poreuse du support. Une telle diffusion assurant ainsi un passage sensiblement uniforme et régulier d'eau au moins partiellement à travers l'épaisseur du support poreux. La solution diffusant au travers le support poreux a
20 avantageusement une température comprise entre 20 et 70°C, en particulier entre 30 et 50°C. Une fois, la couche de polymères absorbables ou bio polymères formée, on sèche avantageusement cette couche, en particulier par lyophilisation. La lyophilisation est avantageusement opérée de la manière décrite pour le séchage de la couche de fibrine. Au cas où le séchage est opéré
25 par lyophilisation, la solution utilisée pour la formation de la couche contient avantageusement un adjuvant polaire, en particulier du glycérol, par exemple à raison de 1 à 15%, en particulier à raison de 5 à 10%.

Des particularités et détails de l'invention ressortiront de la description
30 détaillée suivante d'exemples de réalisation, dans laquelle il est fait référence aux dessins ci-annexés. Dans ces dessins,

- la figure 1 est une vue schématique d'un élément suivant l'invention ;
- la figure 2 est une vue schématique d'une installation pour la préparation d'un élément suivant l'invention ;
- les figures 3, 4 et 5 sont des vues au microscope électronique (Philips XL20 Scanning Electron Microscope), avec agrandissement de 5000 fois, d'une tranche de réseaux de fibrine en coupe transversale avant lyophilisation, tandis que les figures 6, 7 et 8 sont des vues au microscope électronique, avec agrandissement de 5000 fois, d'une tranche de réseaux de fibrine en coupe transversale après lyophilisation;
- 10 - les figures 9, 10 et 11 montrent respectivement, avec un grossissement de 3500 fois, l'aspect en coupe transversale des réseaux obtenus au moyen d'une solution contenant respectivement 1 UI/ml, 10 UI/ml et 20 UI/ml de thrombine;
- les figures 12 à 14 sont des vues au microscope électronique (XL20 de Philips), avec un grossissement de 5000 fois, montrant l'aspect en coupe transversale des réseaux obtenus au moyen d'une solution contenant respectivement pas de CaCl_2 (figure 12), 2,7 mM CaCl_2/ml (figure 13) et 27 mM CaCl_2/ml (figure 14);
- 15 - les figures 15, 16, 17 et 18 sont des vues au microscope électronique (Philips XL20 Scanning Electron Microscope), avec grossissement de 500 fois, de la face supérieure de réseaux de fibrine avec cellules après deux heures de culture;
- 20 - les figures 19 à 21 sont des vues en coupe transversale d'un support poreux 2 portant une couche de fibrine 4 munie de cellules "C", vues au microscope électronique avec un grossissement respectivement de 100 fois, de 100 fois et de 1000 fois;
- 25 - la figure 22 est un diagramme d'électrophorèse de marqueurs de faible poids moléculaire (1,6), de fibrinogène de contrôle (5), de fibrine de contrôle (4), de la couche polymère provenant de l'exsudat (partie passant au travers la membrane poreuse) après incubation, et de la partie surnageante de l'exsudat après incubation.
- 30

La figure 1 montre schématiquement en coupe et à plus grande échelle une partie d'un élément suivant l'invention.

L'élément 1 comporte (a) un support hydrophobe ou sensiblement hydrophobe 2, par exemple en PTFE (expansé et étiré biaxialement) présentant une partie poreuse dont l'épaisseur E est comprise entre 0,1 et 5 mm, par exemple de 300 à 500 μm , et dont les pores P s'étendant au travers de son épaisseur E ont un diamètre « d » moyen (volume poreux / surface des pores) compris entre 5 et 100 μm par exemple d'environ 30 à 40 μm , une face 3 de ladite partie poreuse dudit support 2 étant traitée au moyen d'une composition à base de fibrine et/ou de fibrinogène, et (b) une couche 4 à base de fibrine recouvrant ladite face traitée 3 du support 2.

Ladite couche 4 à base de fibrine est sensiblement uniforme et homogène sur ladite face traitée 3. Après lavage, la couche de fibrine 4 ne contient pas de fibrinogène. Par exemple la teneur en fibrinogène de la couche 4 (fibrinogène non lié au réseau de fibrine) est inférieure à 0,5 % en poids, de préférence inférieure à 0,1% en poids par rapport au poids de la couche de fibrine.

Du fibrinogène F peut s'étendre dans l'épaisseur E de la partie poreuse traitée du support, à partir de ladite face traitée sur une profondeur « e » d'au moins 10 μm à la fois dans les pores de diamètre moyen compris entre 10 et 20 μm (pores dont le volume exprimée en μm^3 divisé par la surface des parois du pore exprimée en μm^2 est compris entre 10 et 20 μm) et dans les pores de diamètre moyen supérieur à 20 μm . En particulier, dans tous les pores de plus de 25 μm de la face traitée de la partie poreuse, du fibrinogène s'étend dans l'épaisseur E du support sur une profondeur « e » d'au moins 30 μm . Toutefois, au niveau de la face 3, le support est sensiblement exempt de fibrinogène non lié au réseau. La non présence de fibrinogène non lié au réseau de fibrine est due au passage d'eau au travers du support poreux. Dans une forme particulière, le support poreux est exempt de fibrinogène sur une profondeur d'au moins 10 μm , à partir de la face portant la couche de fibrine. Selon une forme

particulièrement avantageuse, le support est exempt de fibrinogène dans toute son épaisseur.

La couche de fibrine 4 représentée à la figure 1 est une couche stabilisée par
 5 réticulation grâce à la présence du facteur XIII. Ladite couche 4 forme ainsi un réseau d'alvéoles adjacentes 40.

L'épaisseur « h » de la couche de fibrine calculée à partir de la face 3 (mesurée sous forme déshydratée) est par exemple d'environ $10\mu\text{m}$, tandis que le volume
 10 moyen d'une chambre ou cellule est de l'ordre de $10\mu\text{m}^3$. Les alvéoles sont ouvertes et présentent des passages entre eux. On entend par alvéoles les zones exemptes de fibrine de volume supérieur à $5\mu\text{m}^3$ et qui sont entourées par des liens de fibrine. La répartition des alvéoles dans la couche 4 est sensiblement régulière, c'est-à-dire que le volume des alvéoles pour toute zone de 1cm^2 de
 15 la face 3 recouverte par la couche 4 varie entre 0,8 et 1,2 fois (de préférence entre 0,9 et 1,1 fois) le volume moyen des chambre par unité de surface (cm^2) de la zone. La hauteur moyenne des chambres calculée perpendiculairement à la face 3 est par exemple comprise entre 2 et $3\mu\text{m}$.

20 L'élément représenté à la figure 1 est avantageusement sous une forme sèche. La teneur en humidité est par exemple inférieure à 0,01% en poids, ce qui assure une excellente conservation et stabilité de l'élément. Lors de la réhydratation de l'élément, la couche de fibrine gonfle par exemple d'un facteur supérieur à 1,5, en particulier d'un facteur compris entre 1,6 et 2,5 (l'épaisseur
 25 de la couche de fibrine après réhydratation correspond entre 1,6 et 2,5 fois l'épaisseur de la couche de fibrine sèche).

Selon une forme de réalisation particulière, les pores P présentent des faces internes au moins partiellement recouvertes d'une protéine soluble dans l'eau
 30 ou sensiblement soluble dans l'eau et/ou la face 6 du support opposée à la face traitée est recouverte au moins partiellement d'une protéine soluble dans l'eau ou sensiblement soluble dans l'eau. Un tel recouvrement est avantageux pour

faciliter par exemple la fixation de cellules, l'adhésion des tissus entourant la face opposée à la face traitée par de la fibrine ou des matières contenant du fibrinogène.

- 5 Selon une caractéristique avantageuse d'une forme de réalisation, les pores P (parois internes) de la partie poreuse du support sont au moins partiellement recouverts par un adjuvant organique polaire soluble ou miscible dans l'eau ou par des traces de cet adjuvant. Cet adjuvant organique polaire est
10 avantageusement également présent au moins partiellement sur les liens de fibrine de la couche 4 et sur les faces 3 et 6 du support. Un tel adjuvant est par exemple du glycérol, un sucre, etc. ou encore un mélange de tels adjuvants. Lesdits adjuvants sont en particulier solubles ou au moins miscibles dans l'eau et sont en particulier choisis parmi les adjuvants solubles dans l'eau qui
15 permettent d'abaisser la température de congélation par rapport à la température de congélation de l'eau à pression atmosphérique. La quantité d'adjuvant organique soluble ou miscible présent dans la solution de fibrine, fibrinogène et/ou thrombine ou dans la couche de fibrine réticulée humide (non séchée, teneur en eau des pores de l'ordre de 50%) est de préférence suffisante pour abaisser la température de congélation à pression atmosphérique à moins
20 de -5°C, de préférence à moins de -10°C.

- Bien que le support de la forme représentée est un support poreux biocompatible en PTFE, on aurait pu utiliser un autre support biocompatible et en particulier un support biodégradable ou un support biocompatible et
25 biodégradable.

Des exemples de procédé de préparation d'un élément suivant l'invention seront décrits ci-après.

- 30 Pour la préparation d'élément(s) suivant l'invention, on a utilisé une chambre étanche 10 reliée à une pompe à vide 11 pour mettre sous vide ou en dépression

la chambre par rapport à la pression atmosphérique. Cette chambre est représentée de façon schématique à la figure 2.

La chambre présente une tête d'admission 12 de solution(s) dans l'espace
5 interne ou le creux d'un tube de diamètre intérieur de 1 à 100 mm, et plus particulièrement de 2 à 10 mm. Le tube 13 présente des parties cylindriques poreuses 13A (diamètre moyen des pores compris entre 20 et 30 μ m) séparées entre elles par un anneau non poreux 13B. L'épaisseur du tube était d'environ 200 à 300 μ m pour les parties poreuses. La tête d'admission 12 comporte des
10 moyens pour attacher de manière étanche une extrémité 13C du tube. La tête d'admission 12 est reliée par le conduit 15 à un réservoir 14 contenant une solution aqueuse de matière contenant du fibrinogène (concentration comprise entre 10 et 40 mg/ml) contenant de 0,2 à 20 unités de facteur XIII par ml (IU/ml) et de 100 à 1000 μ g/ml de fibronectine, par le conduit 16 à un réservoir
15 17 contenant une solution aqueuse de thrombine (concentration comprise entre 0,05 et 2 IU/ml), et par le conduit 18 à un réservoir 19 contenant de l'eau et éventuellement un ou des additifs. Les conduits 15,16 et 18 sont munis de vannes V pour permettre ou empêcher le passage d'un fluide. Lesdits conduits permettent d'amener un ou des fluides vers la tête d'admission par rapport à la
20 pression atmosphérique. Un système de régulation 20 permet de contrôler le fonctionnement de la pompe à vide en fonction du vide désiré et du vide mesuré dans la chambre.

L'extrémité du tube opposée à celle attachée à la tête d'admission est fermée
25 par un bouchon 21 avantageusement prolongé par un conduit 22 avec vanne 23 pour permettre une évacuation de fluides ou solutions présents dans le tube hors de celui-ci.

La chambre est également munie de moyens 24 pour amener la température de
30 la chambre à une température comprise entre +60°C et -100°C.

Exemple 1

Dans cet exemple, on a utilisé une solution A contenant 20 mg/ml de matière contenant du fibrinogène . 1000µg de fibronectine par ml et 2 IU/ml de facteur XIII, et une solution B contenant 0,2 IU de thrombine par ml et 40 mM (millimole) de chlorure de calcium par ml.

On a amené dans la tête de distribution la solution A et la solution B au même débit pour obtenir un mélange 1 : 1 de solution A et de solution B. Le mélange ainsi obtenu contenait 10mg/ml de fibrinogène, 500µg/ml de fibronectine, 1 IU/ml de facteur XIII, 0,1 IU/ml de thrombine et 20 mM/ml de CaCl_2 .

On remplit le creux ou espace interne du tube au moyen du mélange de solutions A et B et on abaisse la pression de la chambre à une pression de 0,4 10^5 Pa (soit un vide d'environ 600 millibar par rapport à la pression atmosphérique). Cette mise sous vide crée une aspiration d'eau à travers l'épaisseur des parties poreuses du tube. Etant donné que le vide est créé sur sa face externe, le tube est mis dans un état légèrement tendu ou étiré, ce qui facilite la diffusion de liquide par les pores du tube.

20

Lors de cette mise et maintien sous vide, on remarque que la paroi extérieure du tube est mouillée.

Après avoir maintenu un tel vide pendant environ 1 à 30 minutes, on a progressivement ramené la pression de la chambre à la pression atmosphérique. Après avoir vidé et lavé à l'eau le tube, on a remarqué que la face interne du tube était recouverte d'une couche de fibrine réticulée d'une épaisseur d'environ 5 µm, des chambres ou cellules ouvertes de 15-20µm³ sur les parties poreuses du tube (hauteur des cellules de 2 à 3 µm, surface de 5 à 7 µm² calculée parallèlement à la face du support sur laquelle prend appui la couche. On n'a détecté la présence de fibrinogène non lié à la couche de fibrine dans la couche de fibrine, ni à l'interface du support avec la couche de fibrine. La

30

présence de fibrinogène dans les pores du support a été détecté sur une profondeur (calculée à partir de la face interne du tube) d'au moins environ 20 μm pour tous les pores ayant un diamètre moyen supérieur à 10 μm .

- 5 Le passage de fibrinogène au travers du support poreux a été confirmé par l'électrophorèse de la figure 22. En effet, on a recueilli du liquide sortant par la face opposée à celle en contact avec la solution de fibrinogène. Après incubation de ce liquide, on a déterminé les pics d'électrophorèse de la couche de polymère formée (2) et de la phase surnageante (3). Il ressort qu'après
- 10 incubation, l'électrophorèse (2) présente les pics caractéristiques de la fibrine, ce qui prouve que du fibrinogène a bien passé au travers du support poreux.

On a ensuite soumis ce tube à un séchage au moyen d'un gaz chauffé à 50°C.

15 Exemple 2

- On a répété l'exemple 1, si ce n'est que pour l'étape de lavage on a fait couler de l'eau déminéralisée dans le tube pour évacuer hors du tube la solution de fibrinogène, tout en maintenant une pression d'environ $0,4 \cdot 10^5$ Pa dans la
- 20 chambre pour assurer une diffusion d'eau de lavage à travers le support poreux. Cette diffusion permet de retirer hors du support poreux du fibrinogène.

Exemple 3

- 25 On a répété l'exemple 1 si ce n'est qu'on a séché le tube en abaissant la température du tube à -60°C pour transformer l'eau en glace et en le lyophilisant à cette température.

Exemple 4

30

On a répété l'exemple 3, si ce n'est qu'on a ajouté du glycérol à raison de 5% en poids du mélange constitué de 50% de la solution A et de 50% de la solution

B. On a remarqué que la présence de glycérol à la fois dans le support poreux et dans la couche de fibrine assurait une bonne flexibilité de l'élément. De plus, l'étape de lyophilisation était facilitée.

- 5 La présence du glycérol lors de la formation de fibrine réticulée s'est montrée avantageuse pour permettre d'obtenir une structure régulière et homogène pour la couche de fibrine. De plus, la présence de glycérol a facilitée le passage de fibrine et de fibrinogène dans les pores des parties poreuses du tube.

10 Exemple 5

- On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a ajouté du glycérol à raison de 10% en poids du mélange constitué de 50% de la solution A et de 50% de la solution B. On a remarqué que la présence de glycérol à la fois dans le support poreux et dans la couche de fibrine assurait une bonne flexibilité de l'élément. De plus, l'étape de lyophilisation était facilitée.
- 15

- Des parties de réseaux de fibrine des exemples 2, 3 et 4 avant et après lyophilisation ont été mises en contact dans des boîtes pendant une nuit avec une solution contenant de 2 à 2,5% glutaraldehyde. Ensuite au moyen d'un scalpel chauffé on a coupé transversalement une tranche du réseau fixé au moyen de glutaraldehyde, tranche qui a été déshydratée par des solutions à 40%, à 50%, à 70 %, à 80%, à 90% et à 100% d'éthanol.
- 20

- Les figures 3, 4 et 5 sont des vues au microscope électronique (Philips XL20 Scanning Electron Microscope), avec agrandissement de 5000 fois, de la tranche du réseau de fibrine en coupe transversale avant lyophilisation, respectivement des exemples 2, 3 et 4, tandis que les figures 6, 7 et 8 sont des vues au microscope électronique, avec agrandissement de 5000 fois, de la tranche du réseau de fibrine en coupe transversale après lyophilisation, respectivement des exemples 2, 3 et 4. La comparaison de ces figures montrent que les alvéoles du réseau de fibrine des exemples 2, 3 et 4 avant lyophilisation sont similaires, que les alvéoles du réseau de fibrine des exemples 2, 3 et 4
- 25
- 30

après lyophilisation sont similaires, et que l'utilisation de glycérol permet de réduire la taille des fibres du réseau. Le glycérol, outre son rôle de protection des fibres lors de l'étape de lyophilisation, est donc un agent permettant de contrôler la taille ou le diamètre des fibres du réseau de fibrine.

5

Exemple 6

On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a remplacé le glycérol, une première fois, par du glucose et, une deuxième fois, par du mannitol.

10

Exemple 7

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'on a utilisé une solution contenant du fibrinogène à raison de 10mg/ml et de la thrombine respectivement à raison de 1 UI/ml, 10 UI/ml et 20 UI/ml.

15

Les réseaux ainsi obtenus ont été traités au moyen d'une solution contenant de 2 à 2,5% glutaraldehyde et au moyen de solutions contenant de l'éthanol de la manière décrite à l'exemple 4. Des tranches des réseaux ainsi traités ont ensuite été examinées au microscope électronique (scanning electron microscope, XL20 Philips). Les figures 9, 10 et 11 montrent respectivement, avec un grossissement de 3500 fois, l'aspect en coupe transversale des réseaux obtenus au moyen d'une solution contenant respectivement 1 UI/ml, 10 UI/ml et 20 UI/ml de thrombine.

20

Il ressort de ces figures 9 à 11, qu'un accroissement de la concentration en thrombine de la solution accroît le nombre de fibres, mais diminue la taille de celles-ci.

25

Exemple 8

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'on a préparé des mélanges de solutions de thrombine et de fibrinogène, présentant respectivement une concentration en CaCl_2 de 0 mM/ml, 2,7 mM/ml et 27 mM/ml. Après avoir traité et lavé les

30

réseaux de la manière décrite à l'exemple 4, on a examiné au microscope électronique (XL20 de Philips), avec un grossissement de 5000 fois, l'aspect en coupe transversale des réseaux obtenus au moyen d'une solution contenant respectivement 0 mM/ml (figure 12), 2,7 mM/ml (figure 13) et 27 mM/ml (figure 14). Il ressort de ces figures, qu'un accroissement de la teneur en calcium augmente le nombre de fibres, augmente la taille des fibres et diminue le volume des alvéoles.

10 Exemple 9

On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a utilisé une solution contenant 5% de glycérol, 20 mg/ml de fibrinogène, 500µg de fibronectine par ml, 10 IU/ml de facteur XIII, 1 IU de thrombine par ml et 40 mM de calcium (millimole) par ml.

Exemple 10

On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a contrôlé le vide de la chambre pour le faire varier de manière intermittente entre un vide de 600 mbar par rapport à la pression atmosphérique (pression d'environ $0,4 \cdot 10^5$ Pa) et un vide de 630 mbar par rapport à la pression atmosphérique (pression d'environ $0,38 \cdot 10^5$ Pa). Cette variation de vide s'est révélée avantageuse pour la diffusion de fibrine et fibrinogène dans les pores du support. Après lavage au moyen d'eau en mettant en contact la couche de fibrine avec un courant d'eau et en créant dans la chambre un vide variable entre un vide de 600 mbar par rapport à la pression atmosphérique (pression d'environ $0,4 \cdot 10^5$ Pa) et un vide de 630 mbar par rapport à la pression atmosphérique (pression d'environ $0,38 \cdot 10^5$ Pa). Après lavage, le support et la couche de fibrine ne contenait plus de fibrinogène libre.

30

Le tube peut facilement être soumis, si nécessaire, avant ou après lyophilisation, à une stérilisation à 121°C pendant 60 minutes par exemple dans

un autoclave. Toute autre méthode de stérilisation est possible du moment qu'elle ne détruit pas la structure à alvéoles de la couche de fibrine réticulée, ainsi que la structure du support.

5 Exemple 11

On a répété l'exemple 3, si ce n'est qu'on a contrôlé la concentration en fibrinogène dans le tube au cours de l'étape de diffusion pour assurer une concentration en fibrinogène dans le tube sensiblement constante. Pour ce faire
10 on a ouvert de manière intermittente la vanne 23 pour évacuer de la solution hors du tube et on a amené dans le tube une solution pauvre en fibrinogène ou ne contenant pas de fibrinogène. Ceci permet d'assurer que la couche de fibrine soit sensiblement régulière et homogène dans le sens de son épaisseur.

15 Exemple 12

On a répété l'exemple 11, si ce n'est qu'on a contrôlé de manière sensiblement continue la concentration en fibrinogène pour que cette concentration diminue au fur et à mesure que de la fibrine se dépose sur la paroi interne du tube.

20

Exemple 13

On a répété l'exemple 3, si ce n'est qu'avant de traiter des tubes au moyen de la solution de fibrinogène, on a introduit dans les tubes, soit de l'eau
25 déminéralisée, soit une solution aqueuse contenant 1 mg/ml d'albumine, soit une solution aqueuse contenant 10 mg/ml d'albumine, soit une solution contenant 30 mg/ml d'albumine, pour que les pores se remplissent ou soient gorgés de la dite solution, avant le traitement des tubes au moyen de la solution de fibrinogène.

30

Exemple 14

On a répété l'exemple 3, si ce n'est que la solution contenait 30 mg/ml d'albumine et 10 mg/ml de fibronectine en tant que protéines. D'autres protéines telles que vibronectine, etc. auraient pu être utilisées seules ou en mélange, à la place de l'albumine et/ou de la fibronectine.

5

Ainsi que spécifié dans le document WO96/07444, il est possible de traiter la couche de fibrine, soit pour la dénaturer, soit pour lui donner des propriétés particulières.

La couche de fibrine peut être traitée par de l'eau, un ou des sels (éventuellement en solution), par des additifs pour favoriser la bio-compatibilité du support muni de la couche de fibrine. Les additifs sont par exemple choisis parmi les protéines, les inhibiteurs de coagulation du sang, des composés anti-inflammatoires, des composés diminuant le rejet de greffes, des cellules vivantes, des inhibiteurs de croissance cellules, des agents stimulant les
15 cellules endothéliales, des antibiotiques, des antineoplastiques, du matériel génétique, des protéines qui favorisent ou stimulent la croissance et/ou l'attachement de cellules endothéliales sur la couche de fibrine réticulée, des facteurs de croissance, des facteurs de croissance pour la liaison héparine, substance contre le cholestérol (ZOCOR ®), etc. Des exemples d'additifs
20 particuliers sont décrits dans le document US 5,660,873 dont le contenu est inclus dans la présente demande par référence.

La couche de fibrine peut si nécessaire être partiellement hydrolysée, par exemple au moyen d'une plasmine.

25

Exemple 15

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'on a introduit dans une première étape dans le tube la solution A pour obtenir par création d'un vide dans la chambre,
30 une couche de fibrine et de fibrinogène non réticulé, et que dans une deuxième

étape on introduit dans le tube, la solution B (thrombine) pour former des monomères de fibrine et obtenir une structure réticulée.

Exemple 16

5

On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a opéré la lyophilisation en plusieurs étapes, à savoir l'abaissement de la température à -58°C , le maintien de cette température de -58°C avec mise sous vide (l'appareil de lyophilisation avait été réglé avec une pression de consigne de 7 Pa, de sorte que la pompe à vide a fonctionné en continu) pendant 1 à 5 heures, l'accroissement de la température de -58°C jusque -20°C à -30°C avec maintien du vide, maintien de la température entre -20°C et -30°C avec maintien du vide pendant au moins 10 heures (de 10 à 100 heures), accroissement de la température à $+20^{\circ}\text{C}$ avec maintien du vide.

15

Exemple 17

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'on a traité successivement le tube poreux au moyen de la solution A et au moyen de la solution B.

20

Les étapes de traitement de cet exemple sont les suivantes :

- a) introduction de la solution A (fibrinogène) dans le tube;
- b) mise sous vide de l'espace extérieur au tube pour aspirer la solution A au travers des parois du tube;
- 25 c) élimination de la solution A encore présente dans le tube;
- d) incubation de la couche de fibrinogène déposée pendant 15 minutes à température ambiante (les étapes a), b), c) et d) sont éventuellement répétées une ou plusieurs fois, par exemple deux à trois fois avant l'étape e);
- e) introduction de la solution B (thrombine) dans le tube;
- 30 f) mise sous vide de l'espace extérieur au tube pour aspirer la solution B au travers des parois du tube;
- g) élimination de la solution B encore présente dans le tube;

- h) incubation de la couche à 37°C pendant 30 minutes;
- i) introduction de la solution A (fibrinogène) dans le tube;
- j) mise sous vide de l'espace extérieur au tube pour aspirer la solution A au travers des parois du tube;
- 5 k) élimination de la solution A encore présente dans le tube
- l) incubation de la couche pendant 15 minutes à température ambiante (les étapes i,j,k et l sont éventuellement répétées une ou plusieurs fois);
- m) incubation de la couche pendant 90 minutes à 37 °C.

10 Exemple 18

On a répété l'exemple 16, si ce n'est qu'on n'a pas procédé aux étapes d'incubation intermédiaire d,h et l.

15 Exemple 19

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'on a traité successivement le tube poreux au moyen de la solution A et au moyen de la solution B.

- 20 Les étapes de traitement de cet exemple sont les suivantes :
- a) introduction de la solution A (fibrinogène) dans le tube;
 - b) mise sous vide de l'espace extérieur au tube pour aspirer la solution A au travers des parois du tube;
 - c) élimination de la solution A encore présente dans le tube;
 - 25 d) incubation de la couche de fibrinogène déposée pendant 15 minutes à température ambiante;
 - e) introduction de la solution B (thrombine) dans le tube;
 - f) mise sous vide de l'espace extérieur au tube pour aspirer la solution B au travers des parois du tube;
 - 30 g) élimination de la solution B encore présente dans le tube;
 - h) incubation de la couche à 37°C pendant 30 minutes;
 - i) lavage du tube au moyen d'eau (de préférence lavages successifs);

- j) les étapes a à i sont répétées une ou plusieurs fois;
k) incubation de la couche pendant 90 minutes à 37 °C.

Exemple 20

5

On a répété l'exemple 4, si ce n'est qu'on a ajusté au moment de son introduction le pH du mélange de solutions respectivement à 6, 6,5, 7 et 7,5, ou si ce n'est qu'on a contrôlé lors du procédé le pH de la solution présente dans le tube pour le maintenir par exemple à 6,5 ou 7 ou 7,5.

10

Exemple 21

On a répété l'exemple 1, si ce n'est qu'au lieu de placer le tube poreux dans une chambre de mise sous vide, on a placé le tube dans un récipient contenant une solution aqueuse concentrée de sel (NaCl) pour créer par effet d'osmose inverse une diffusion d'eau et de fibrine-fibrinogène à travers la paroi de tube vers ladite solution concentrée.

15

Exemple 22

20

On a injecté dans un tube au moyen d'une seringue la composition de fibrinogène et de thrombine de l'exemple 1, pour obtenir sur la paroi interne du tube une couche de fibrine. De par ce procédé, du fibrinogène est présent sur la paroi interne du tube et dans la couche de fibrine au voisinage de ladite paroi interne.

25

Après avoir enlevé la solution de fibrinogène et un trempage du tube dans de l'eau (prélavage), on a placé le tube dans la chambre de mise sous vide utilisé à l'exemple 1. On a introduit alors dans le tube de l'eau déminéralisée et on a ensuite créé un vide dans la chambre (pression de $0,3 \cdot 10^5$ Pa) pour créer une aspiration d'eau à travers la paroi du tube depuis la paroi interne vers la paroi externe. Cette diffusion d'eau à travers la paroi du tube permet de retirer le

30

fibrinogène non lié au réseau de fibrine hors de la couche de fibrine et hors du support, de sorte qu'au moins la partie du tube située au voisinage de la paroi interne du tube et la couche de fibrine sont exemptes de fibrinogène.

5 Exemple 23

On a répété l'exemple 22, si ce n'est que pour le lavage par diffusion d'eau au travers de la paroi du tube, on a utilisé une solution aqueuse contenant 5 % de glycérol.

10

Exemple 24

On a répété l'exemple 22, si ce n'est que pour le lavage par diffusion d'eau au travers de la paroi du tube, on a utilisé une solution aqueuse contenant 5 % de glycérol et 1% d'albumine.

15

Pour la préparation des couches de fibrine dans les exemples ci-dessus, on a utilisé du fibrinogène et de la thrombine provenant de sang humain. On aurait pu utiliser en lieu et place de ces produits, des produits du commerce tel que des colles biologiques de CRYOLIFE, par exemple le produit FibRx, ou de VITEX (produit VIGuard), ou encore du fibrinogène recombinant.

20

25 Les éléments ou membranes suivant l'invention, par exemple les membranes des exemples 1 à 13, trouvent de nombreuses applications, par exemple en tant que membrane pour bioréacteur, par exemple du type décrit dans la demande EP 96910867, membrane pour filtre, implant tel qu'organe interne artificiel, veine artificielle, artère artificielle, matériel antithrombique, valve cardiaque, 30 peau artificielle la membrane peut également trouver d'autres applications dans la réalisation de kits ou appareils de test, ...

Des tests ont été effectués pour déterminer la morphologie des cellules attachées sur un réseau de fibrine lyophilisé préparé sans ajout de glycérol (exemple 3), sur un réseau de fibrine préparé à partir d'une solution contenant environ 5% de glycérol (exemple 4) avant lyophilisation et après lyophilisation, 5 et sur un réseau de fibrine préparé à partir d'une solution contenant environ 10% de glycérol (exemple 6) avec lyophilisation.

Pour ces tests, on a préparé un milieu de culture à partir de Dubbelco Modified Eagle Medium (DMEM). A ce milieu DMEM, on a ajouté, en % en poids de 10 solution DMEM, les ingrédients suivants :

- 20% de HAM'S F 12 (milieu de culture)
- 10% de FCS (Foetal Calf serum, serum de foetus de veau)
- 1% d'acides aminés non essentiels (à savoir L-alanine, L-asparagine, L-acide aspartique, L-acide glutamique, Glycine, L-proline, L-serine)
- 15 - 1% de pyruvate de sodium
- 1% de Penicillium streptomycine, et
- 1% de L-glutamine.

Ce milieu est appelé ci-après "milieu DMEM préparé".

20 Les cellules utilisées dans ces tests ont été isolées de la manière suivante.

Juste après l'abattage des bovins, on a récupéré l'aorte des bovins. Après avoir séparé les tissus adipeux des aortes, on a ligaturé les artères collatérales. La surface interne des aortes a été traitée pendant 15 minutes à 37°C avec une 25 solution contenant 250 IU/ml de collagénase. Les cellules libérées lors de ce traitement sont récupérées et placées dans un milieu de culture DMEM contenant de la valine D , 10% de FCS , 100 UI/ml de penicilline, 100µg/ml de streptomycine et 2,5 µg/ml d'amphotéricine B. Le milieu de culture a été renouvelé après 24 heures.

Deux jours après, le milieu de culture a été placé dans un milieu de culture DMEM à 70%, contenant 20% de HAM'S F 12, 10% de FCS, 100 UI/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 2,5 µg/ml d'amphotéricine B.

- 5 Dès que les cellules atteignent leur confluence, elles sont récupérées au moyen de trypsine (1mg/ml) en présence de EDTA (acide tétracétique d'éthylène diamine).

Elles sont ensuite mises en culture dans le "milieu DMEM préparé".

10

- Avant d'ajouter des cellules dans des boîtes de Pétri contenant un support muni d'un réseau de fibrine, les cellules ont été récupérées du milieu DMEM préparé par incubation dans un milieu trypsine-EDTA (avec un taux de concentration de 5 fois) pendant 5 minutes à 37°C, ensuite 10 ml d'un milieu de culture
15 contenant 10% de FCS ont été ajoutés pour arrêter l'action de l'enzyme. Le nombre de cellules dans le milieu a été estimé par comptage au microscope des cellules présentes dans une chambre de Bürker après marquage au tryptan bleu. Cette méthode est appelée ci-après méthode de comptage au microscope. Le nombre de cellules mesuré correspondait à 25.000 cellules/ml pour une
20 première solution et 125.000 cellules/ml pour une deuxième solution.

- 2 ml du milieu de culture contenant respectivement 50.000 cellules et 250.000 cellules ont été ajoutés chacun séparément dans les différentes boîtes de Pétri contenant respectivement un réseau de fibrine lyophilisé préparé sans ajout de
25 glycérol (Boîtes 1), un réseau de fibrine préparé à partir d'une solution contenant environ 5% de glycérol (exemple 4) avant lyophilisation (Boîtes 2) et après lyophilisation (Boîtes 3), et un réseau de fibrine préparé à partir d'une solution contenant environ 10% de glycérol (exemple 5) avec lyophilisation (Boîtes 4).

30

La culture des cellules dans les boîtes de Pétri a eu lieu à 37°C pendant 2 heures pour un premier lot de boîtes (boîtes contenant 50.000 cellules) et

pendant 11 jours pour un deuxième lot de boîtes (boîtes contenant 250.000 cellules). Après le temps de culture de soit 2 heures, soit 11 jours, les réseaux de fibrine des boîtes de Pétri ont été fixés au moyen d'une solution à 2,5% de glutaraldehyde. Les figures 15, 16, 17 et 18 sont des vues au microscope électronique (Philips XL20 Scanning Electron Microscope), avec grossissement de 500 fois, de la face supérieure du réseau de fibrine après deux heures de culture, respectivement des boîtes 1, 2, 3 et 4. Ces figures montrent qu'après un temps de culture de deux heures, l'accrochage des cellules sur les réseaux de fibrine des différentes boîtes est bon. Les cellules sont réparties sur la face supérieure de manière régulière et de manière plate.

Pour les boîtes soumises à une culture pendant 11 jours à 37°C, on a effectué au cours de la culture un examen visuel des boîtes. Cet examen a montré qu'après 8 jours de culture, la fibrinolyse du réseau de la boîte 1 (réseau de fibrine sans glycérol) était visible, alors qu'aucune fibrinolyse n'était perceptible pour les réseaux des boîtes 2, 3 et 4 après 8 jours de culture.

Après 11 jours de culture, on a mesuré pour la boîte 1 et pour les boîtes 2 et 3, le nombre de cellules viables. Le nombre de cellules viable a été estimé un kit enzymatique WST-1 de Boehringer Mannheim (Cat n° 1644807 – lot n° 14890800). Le principe de cette méthode est basé sur le clivage par une enzyme mitochondriale (succinate-tetrazolium reductase) d'un sel de tetrazolium, ajouté au milieu, en formazan. Cette réduction n'a lieu que dans les cellules viables. La couleur formazan produite par les cellules métaboliquement actives est quantifiée par un spectrophotomètre à balayage (ELISA reader). Pour cette détermination, on a remplacé le milieu de culture des boîtes de Pétri 1, 2 et 3 par 1 ml d'un milieu frais contenant 100µl de la solution du kit enzymatique WST-1. Après quatre heures d'incubation à 37°C sous une atmosphère contenant 7% de CO₂, 100µl de la solution colorée de chacune des boîtes sont prélevés pour être analysés dans le spectrophotomètre. On a ainsi déterminé pour les différentes solutions la différence entre le pic d'absorbance à 450 nm par rapport à l'absorbance à 655 nm. On a ainsi observé

une différence d'absorbance de loin plus importante (40 à 50% supérieure) pour les boîtes 2 et 3, par rapport à celle observée pour la boîte 1. La différence d'absorbance des boîtes 1, 2 et 3 était au moins quatre fois supérieure à celle d'un témoin ne comprenant pas de cellules. Cette analyse montre que
5 des cellules des boîtes 1, 2 et 3 sont viables, mais que de plus la présence de glycérol assure une meilleure viabilité des cellules.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Elément présentant une couche à base de fibrine ou de matière contenant du fibrinogène, ledit élément comportant (a) un support hydrophobe ou sensiblement hydrophobe présentant une partie poreuse dont l'épaisseur est comprise entre 0,1 et 5 mm et dont les pores s'étendant au travers de son épaisseur ont un espace internodal compris entre 5 et 100 μ m, une face de
10 ladite partie poreuse dudit support étant traitée au moyen d'une composition à base de fibrine et/ou de matière contenant du fibrinogène, et (b) une couche à base de fibrine recouvrant ladite face traitée du support, caractérisé en ce que ladite couche à base de fibrine est sensiblement uniforme et homogène sur ladite face traitée, et en ce que la couche de
15 fibrine et au moins la face du support en contact avec la couche de fibrine sont sensiblement exempts de fibrinogène.
2. Elément suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la couche de fibrine et au moins la couche du support s'étendant sur une épaisseur de 10 μ m contient moins de 1% en poids, avantageusement moins de 0,5 %, de
20 préférence moins de 0,1% en poids de fibrinogène n'ayant pas réagi par rapport au poids de la couche de fibrine.
3. Elément suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que de la fibrine s'étend dans l'épaisseur de la partie poreuse traitée du support, à partir de ladite face traitée sur une profondeur d'au moins 2 μ m, à la fois dans les
25 pores de diamètre moyen compris entre 10 et 20 μ m et dans les pores de diamètre moyen supérieur à 20 μ m.
4. Elément suivant l'une des revendications précédentes, dans lequel la partie poreuse du support présente une porosité sensiblement homogène et uniforme sur sa face traitée, caractérisé en ce que de manière homogène et
30 uniforme de la fibrine s'étend dans l'épaisseur de la partie poreuse du support sur une profondeur d'au moins 10 μ m.

5. Elément suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le support poreux contient du fibrinogène dans une couche distante de plus de 10 μ m de la face en contact avec la couche de fibrine.
6. Elément suivant la revendication 5, caractérisé en ce que du fibrinogène s'étend dans l'épaisseur du support sur une profondeur d'au moins 20 μ m.
7. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'au moins la face de la couche de fibrine opposée à celle touchant le support poreux est stabilisée.
8. Elément suivant la revendication 7, caractérisé en ce que ladite couche à base de fibrine est au moins partiellement réticulée pour former un réseau d'alvéoles adjacentes.
9. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite couche est munie de cellules et/ou de protéines, en particulier de protéines favorisant la liaison cellules-fibrine.
10. Elément suivant l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que la couche à base de fibrine réticulée couvrant la partie poreuse du support a une épaisseur, mesurée sous forme sèche, comprise entre 0,5 et 100 μ m, de préférence entre 2,5 et 50 μ m, des alvéoles étant formées entre les molécules ou liens ou fibre à base de fibrine réticulées, lesdites alvéoles présentant un volume compris entre 5 et 25 μ m³, l'épaisseur ou la hauteur moyenne de ladite alvéole étant comprise entre 1 et 5 μ m, de préférence entre 1 et 3 μ m.
11. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les pores de la partie du support recouverte de ladite couche de fibrine présentent des faces internes au moins partiellement recouvertes d'une protéine soluble dans l'eau ou sensiblement soluble dans l'eau.
12. Elément suivant la revendication 11, caractérisé en ce que la face du support opposée à la face traitée est recouverte au moins partiellement d'une protéine soluble dans l'eau ou sensiblement soluble dans l'eau.

13. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'au moins les pores de la partie poreuse du support sont recouverts d'un adjuvant organique polaire soluble ou miscible dans l'eau.
14. Elément suivant la revendication 13, caractérisé en ce que le réseau de
5 fibres de fibrine réticulée est recouvert au moins partiellement et/ou contient un adjuvant polaire soluble ou miscible à l'eau, de préférence un adjuvant choisi parmi le groupe comprenant le glycérol, les sucres et leurs mélanges.
15. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes,
10 caractérisé en ce qu'il présente une teneur en humidité de moins de 0,5% en poids, de préférence de moins de 0,1% en poids.
16. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que de la fibronectine est attachée à la couche de fibrine, la teneur en fibronectine par rapport au poids de fibrine et de fibronectine
15 de la couche étant comprise entre 0,5 et 15 %.
17. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la couche de fibrine contient du calcium à raison de 1 à 100µg, de préférence de 10 à 50 µg de calcium par cm³ de volume de couche de fibrine.
- 20 18. Elément suivant la revendication 14, caractérisé en ce que le calcium se présente sous la forme de chlorure de calcium.
19. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en que le support est muni de deux couches de fibrine superposées, la couche en contact avec le support présentant des alvéoles de
25 plus grand volume que les alvéoles de la couche recouvrant la couche de fibrine en contact avec le support.
20. Elément suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le support est bio-compatible et/ou biodégradable.
21. Procédé de préparation d'un élément suivant l'une quelconque des
30 revendications 1 à 20, dans lequel on met au moins une partie poreuse d'une première face d'un support poreux en contact avec une solution aqueuse contenant de la fibrine ou une matière contenant du fibrinogène,

dans lequel on soumet, de manière sensiblement homogène et uniforme, la face de la partie poreuse du support opposée à ladite première face, à un effort d'aspiration d'au moins une partie de la solution au travers de ladite partie poreuse, assurant, de manière homogène et uniforme par rapport à ladite partie poreuse, un dépôt d'une couche à base de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène et une diffusion au moins d'eau de la solution à travers l'épaisseur de la partie poreuse du support poreux et une pénétration de fibrine ou de fibrinogène dans le support poreux.

22. Procédé suivant la revendication 21, dans lequel on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa et dans lequel on crée entre les deux faces de la partie poreuse une différence de pression d'au moins $0,3 \cdot 10^5$ Pa.
23. Procédé suivant la revendication 22, caractérisé en ce qu'on soumet la face du support opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,5 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure à ou environ égale à $0,4 \cdot 10^5$ Pa.
24. Procédé suivant la revendication 22 ou 23, dans lequel on soumet la face du support opposée à la première face de manière intermittente à une première pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure à $0,4 \cdot 10^5$ Pa, et à une deuxième pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa, de préférence inférieure à $0,4 \cdot 10^5$ Pa, la première pression étant au de 5% supérieure à la deuxième pression.
25. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face à une pression inférieure à $0,8 \cdot 10^5$ Pa et à une température comprise entre 0 et 100°C , de préférence à une température comprise entre 15 et 60°C .
26. Procédé suivant la revendication 21, dans lequel on soumet la face du support poreux opposée à ladite première partie à une solution choisie pour créer un phénomène d'osmose inverse induisant une diffusion au moins d'eau de la solution en contact avec la première face à travers la partie poreuse du support.

27. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 26, caractérisé en ce qu'on utilise une solution contenant de 5 à 20 mg/ml de matières contenant du fibrinogène.
28. Procédé suivant la revendication 27, caractérisé en ce qu'on utilise une
5 solution contenant de 5 à 20 mg/ml de matières contenant du fibrinogène et de 0,01 à 10 unités de thrombine par ml.
29. Procédé suivant la revendication 28, caractérisé en ce qu'on utilise une solution contenant de 5 à 20 mg/ml de matières contenant du fibrinogène, du facteur XIII et de 0,01 à 2 unités de thrombine par ml.
- 10 30. Procédé suivant la revendication 29, caractérisé en ce qu'on utilise une solution contenant de 0,1 à 10 unités de Facteur XIII par ml.
31. Procédé suivant l'une des revendications 27 à 30, caractérisé en ce que la solution contient de 1 à 40 millimole de chlorure de calcium par ml.
32. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 27 à 31, caractérisé en
15 ce que la solution contient de 0 à 20% en poids, de façon avantageuse de 3 à 15%, de préférence de 5 à 10% d'adjuvant organique polaire soluble ou miscible dans l'eau.
33. Procédé suivant la revendication 32, caractérisé en ce que l'adjuvant est le glycérol.
- 20 34. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 33, caractérisé en ce que dans une première étape on met au moins une partie d'une première face d'un support poreux en contact avec une solution contenant de la fibrine et/ou des matières contenant du fibrinogène, dans lequel on soumet la face du support poreux opposée à ladite première face, à un effort
25 d'aspiration pour assurer, de manière homogène et uniforme par rapport à ladite partie poreuse de la première face, une diffusion au moins d'eau de la solution à travers l'épaisseur du support poreux et une pénétration de fibrine et/ou de fibrinogène dans l'épaisseur du support poreux, et en ce que dans une seconde étape on soumet la couche de fibrine et/ou de fibrinogène
30 à une stabilisation.

35. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 34, caractérisé en ce qu'on assure un contact de ladite partie de la première face avec une solution aqueuse en mouvement.
36. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 35, caractérisé en ce qu'on utilise de l'eau ou une solution aqueuse contenant un agent mouillant pour remplir les pores du support poreux avant de mettre ledit support en contact avec la solution contenant de la fibrine ou des matières contenant du fibrinogène.
37. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 36, caractérisé en que la couche à base de fibrine est soumise à une étape de séchage, éventuellement après une étape de lavage.
38. Procédé suivant la revendication 37, caractérisé en ce que le séchage est opéré au moins partiellement par lyophilisation, de façon avantageuse à une température comprise entre -30°C et -100°C , de préférence à une température entre -40°C et -70°C .
39. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 28 à 38, caractérisé en ce qu'au moins pour une partie du dépôt de la couche à base de fibrine ou de matières contenant du fibrinogène, on contrôle la concentration en fibrine ou de matières contenant du fibrinogène de la solution en contact avec la première face pour assurer une diffusion sensiblement constante d'eau au travers du support.
40. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 39, caractérisé en ce qu'on utilise un support poreux bio compatible et/ou bio dégradable.
41. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 21 à 40, caractérisé en ce qu'on traite la partie poreuse au moyen d'une solution aqueuse contenant avantageusement un agent de mouillage, une protéine ou un adjuvant organique polaire ou un mélange de ceux-ci, avant de mettre la solution contenant de la fibrine et/ou des matières contenant du fibrinogène en contact avec ladite partie poreuse.
42. Filtre comprenant une membrane constituée d'un élément suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.

- 43. Bioréacteur comprenant une membrane constitué d'un élément suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.
- 44. Implant constitué d'un élément suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.
- 5 45. Peau artificielle constituée à partir d'un élément suivant l'une quelconque des revendications 1 à 20.

FIG 1

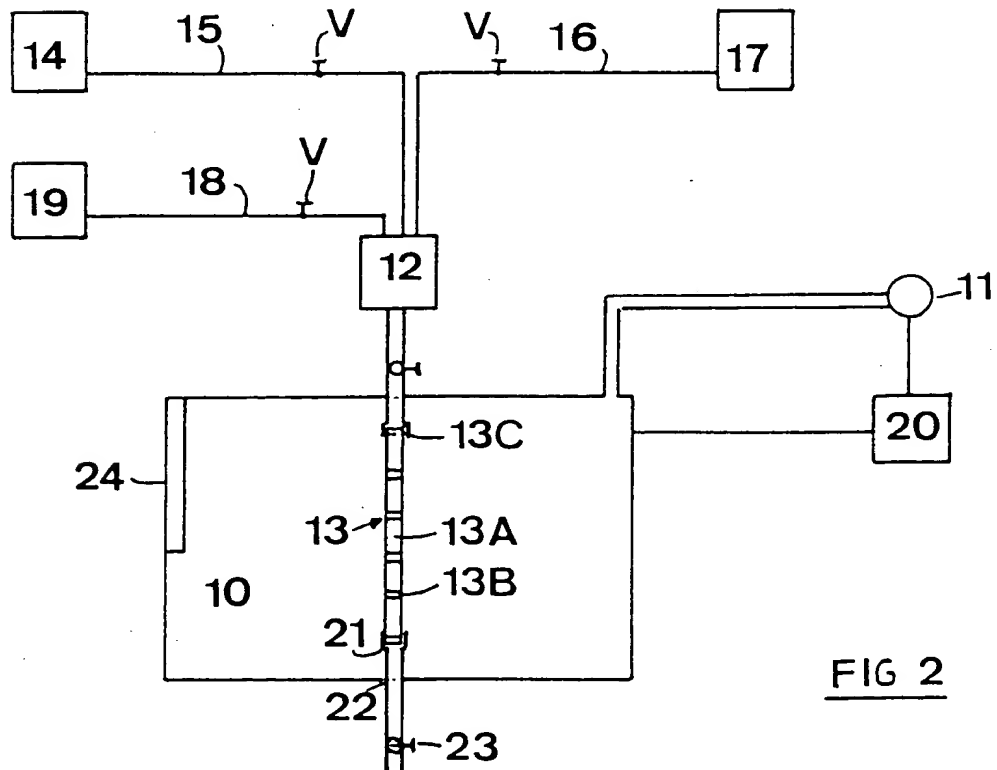
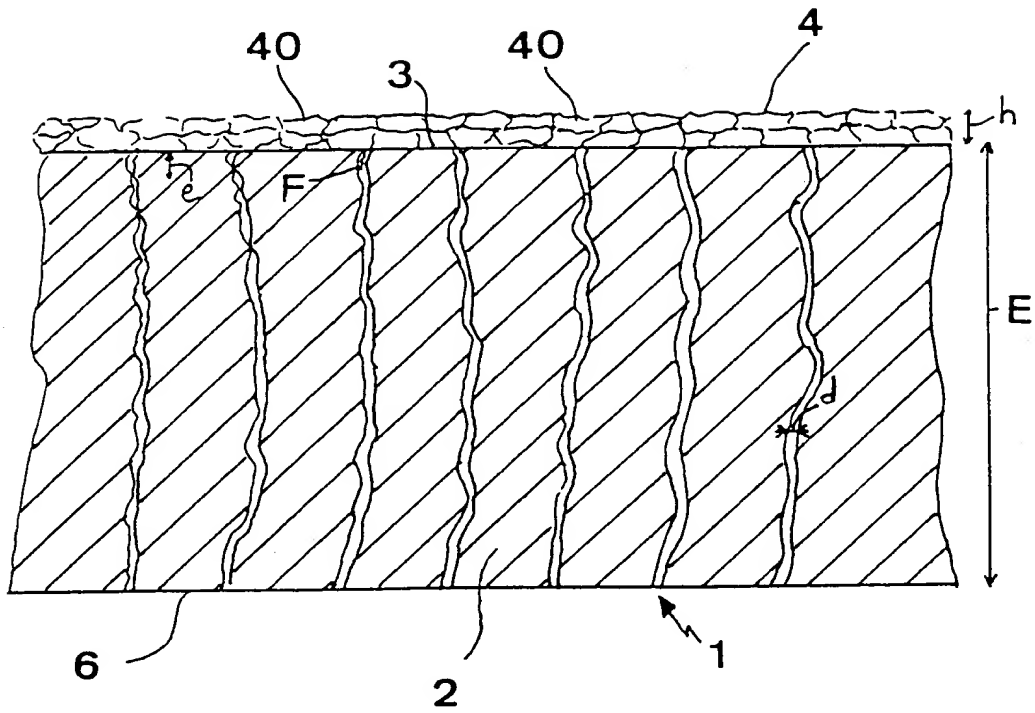


FIG 2

45

Fig. 3

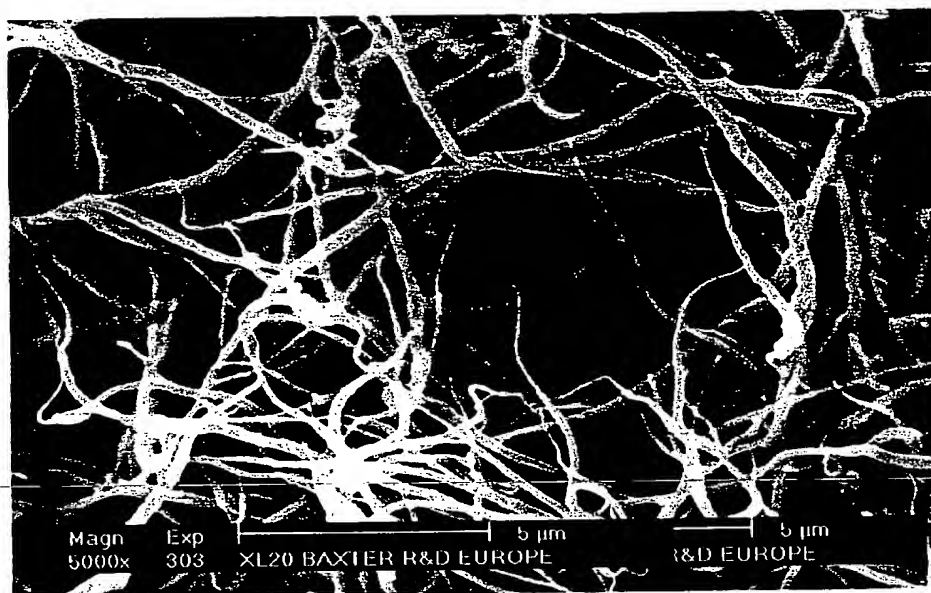
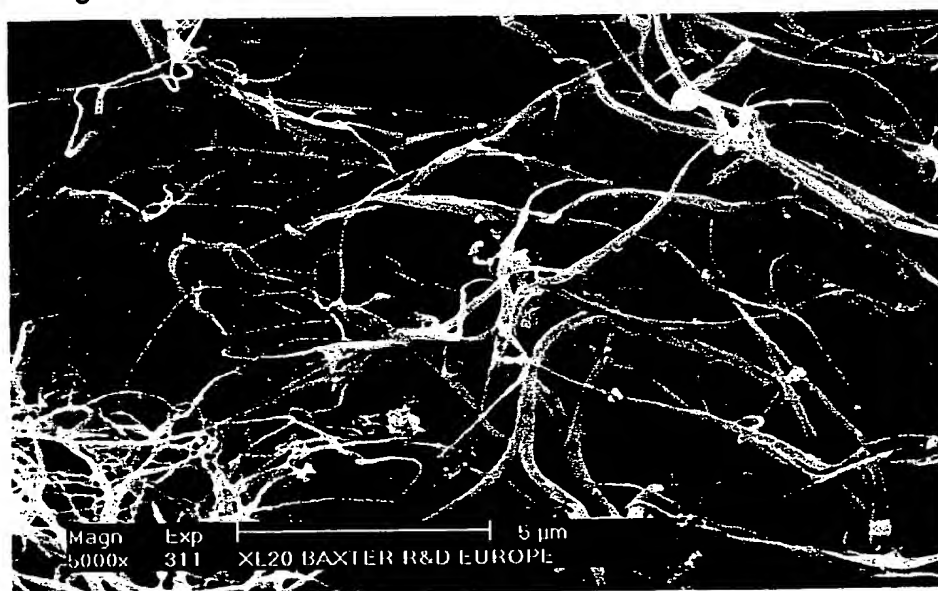


Fig. 4



46

Fig.5

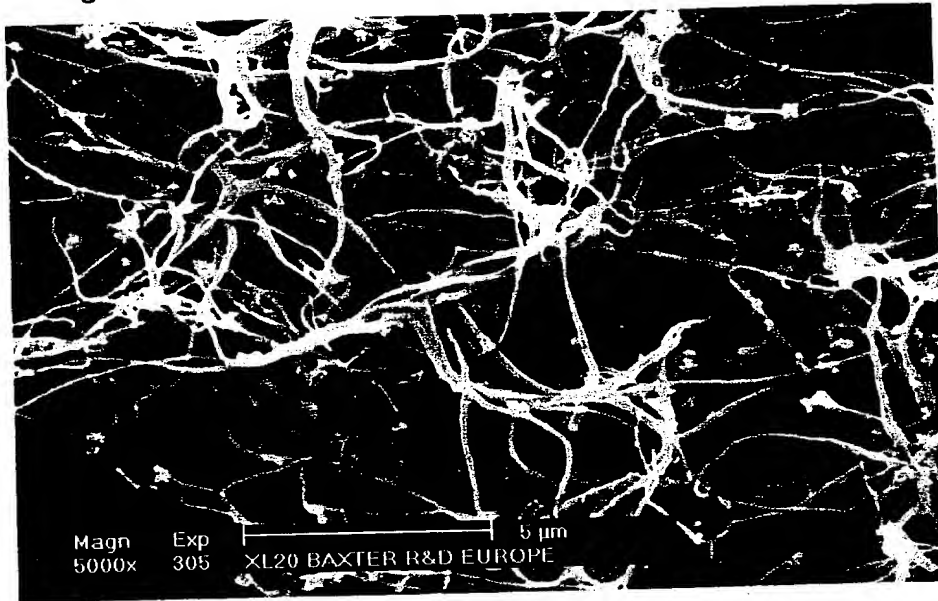


Fig.6

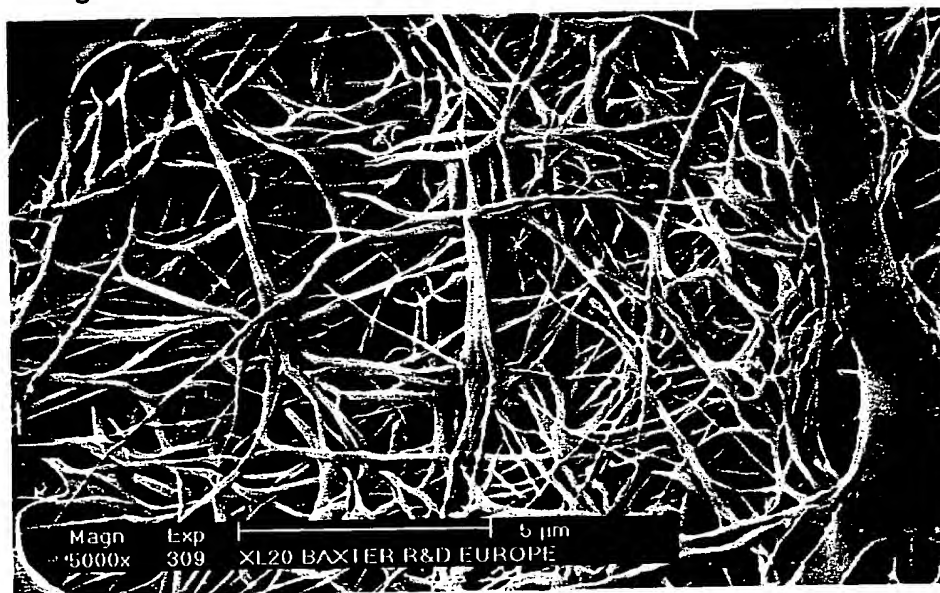


47

Fig.7



Fig. 8



48

Fig.9

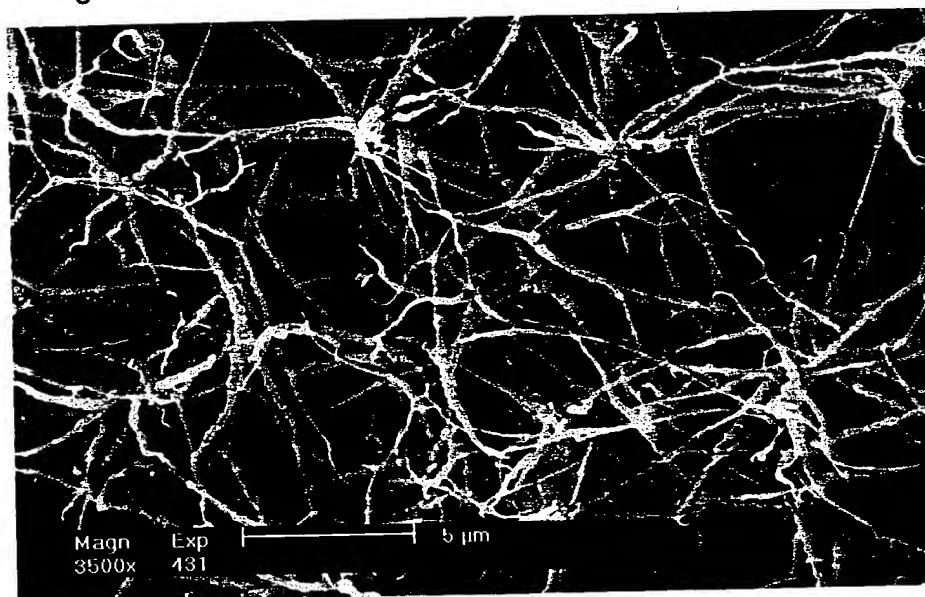


Fig. 10

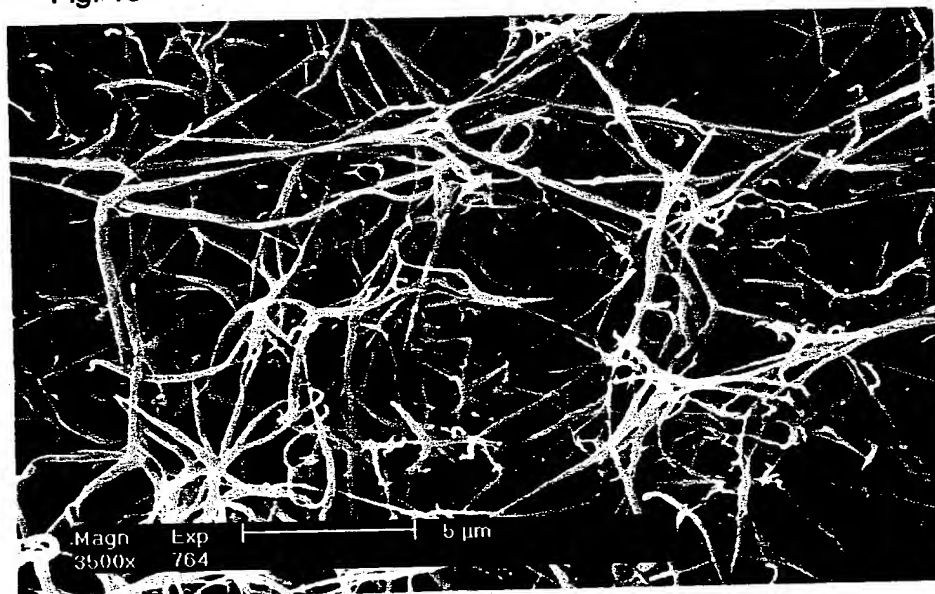


Fig.11

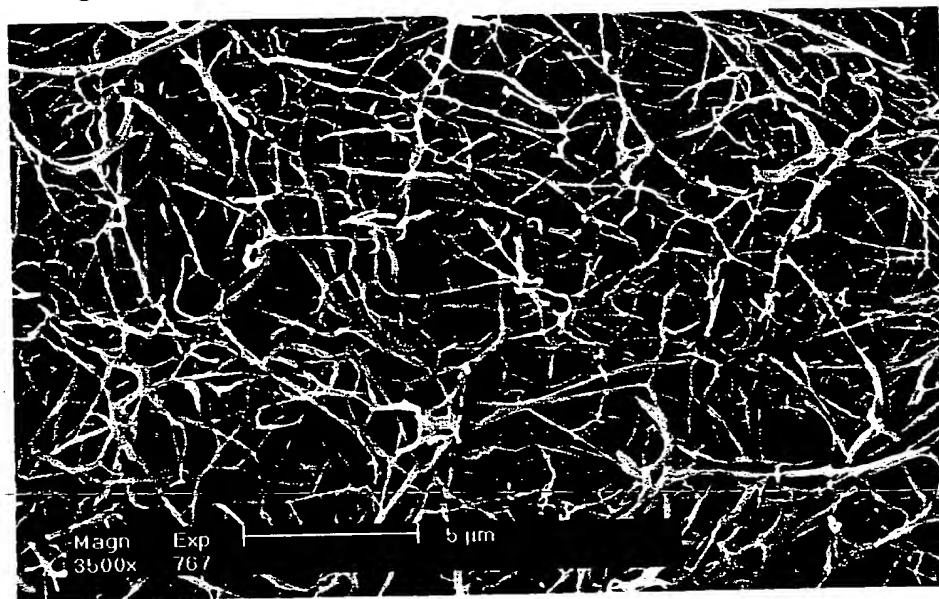
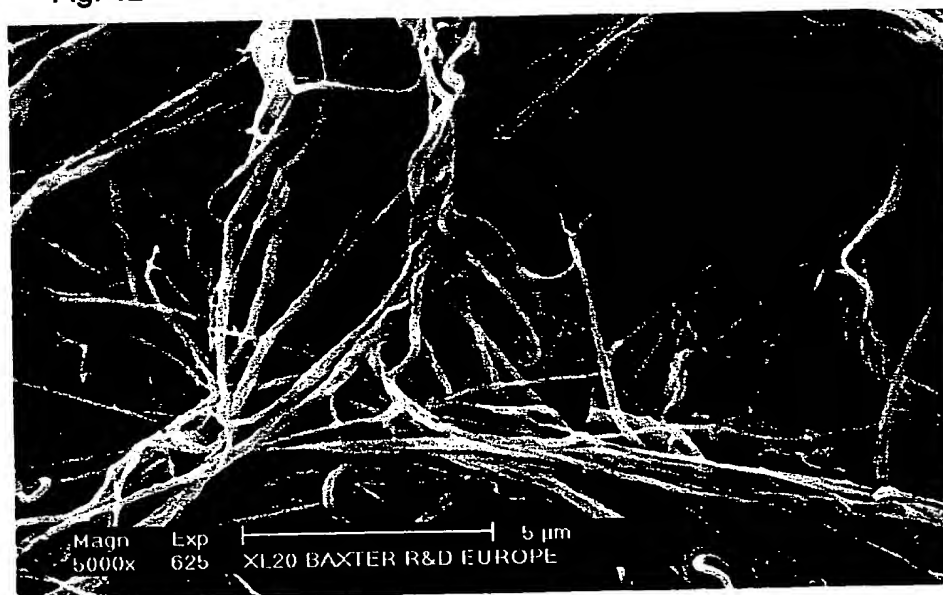


Fig. 12



50

Fig.13

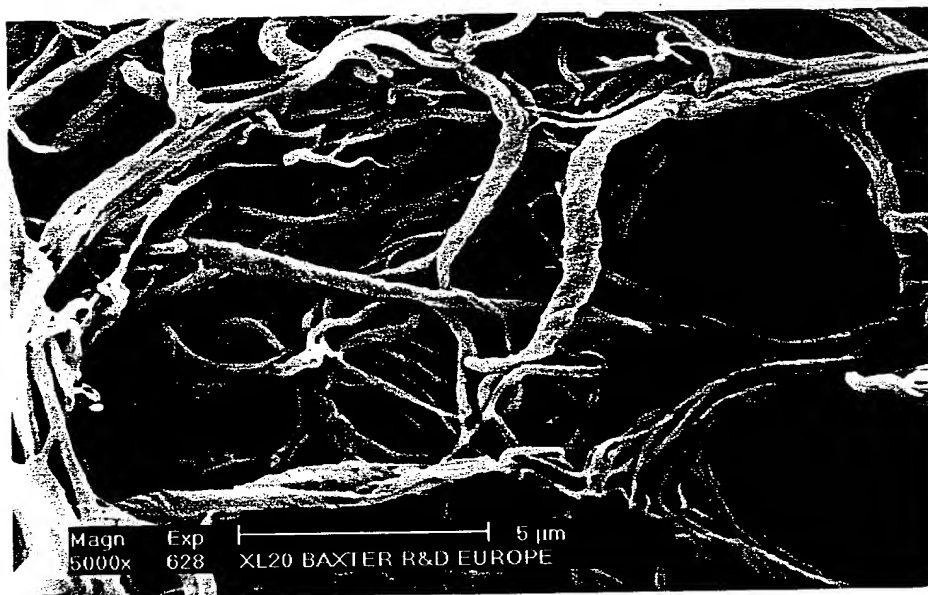
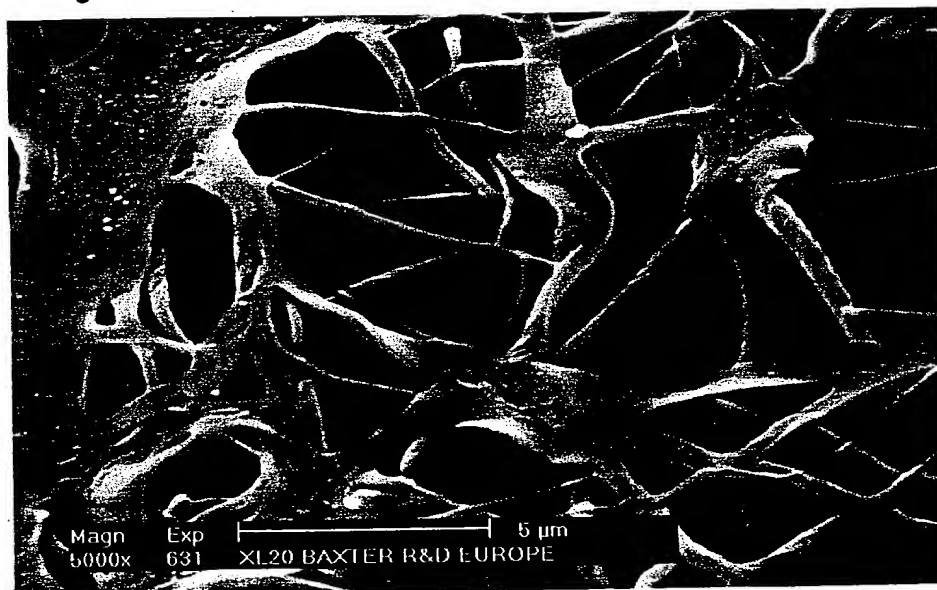


Fig. 14



51

Fig. 15

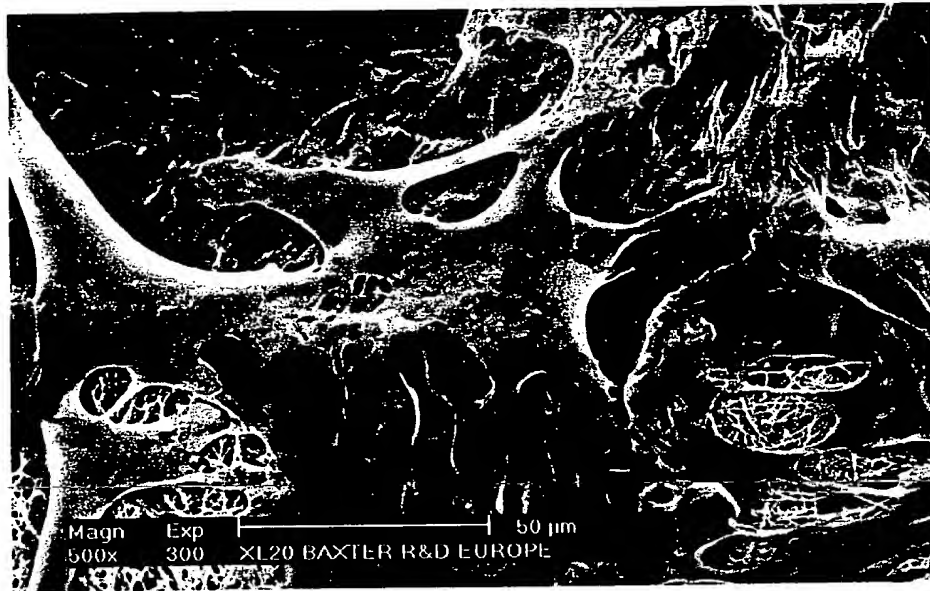
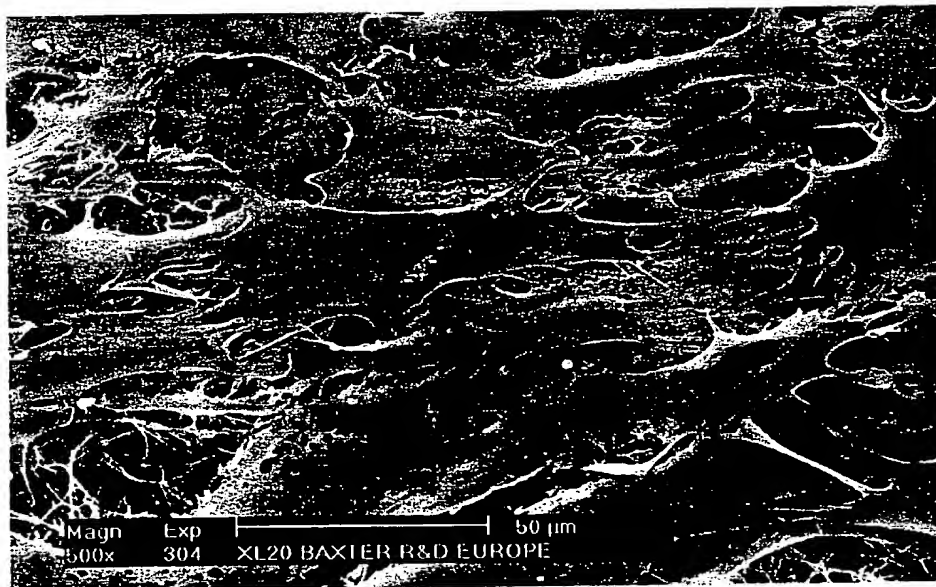


Fig. 16



52

Fig. 17

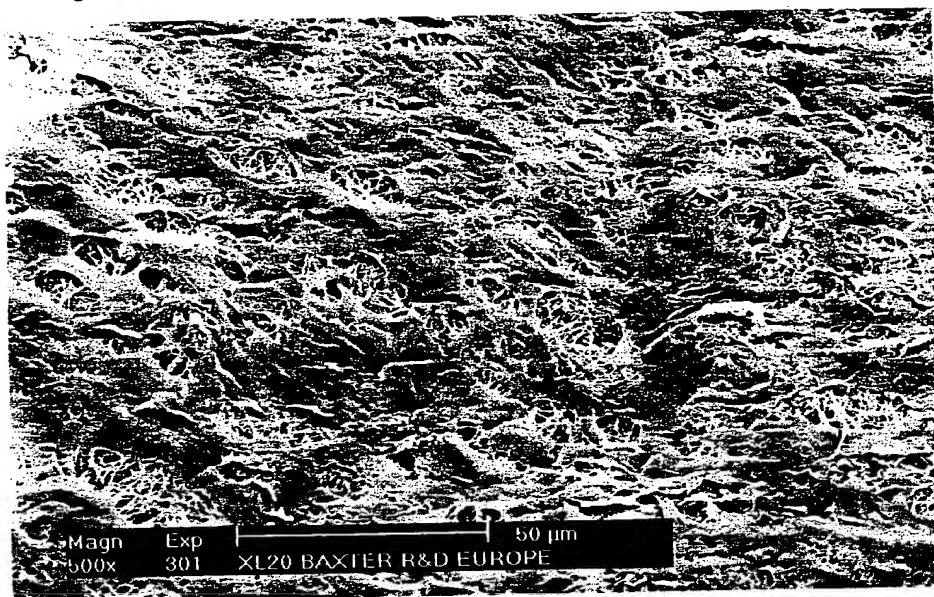


Fig. 18

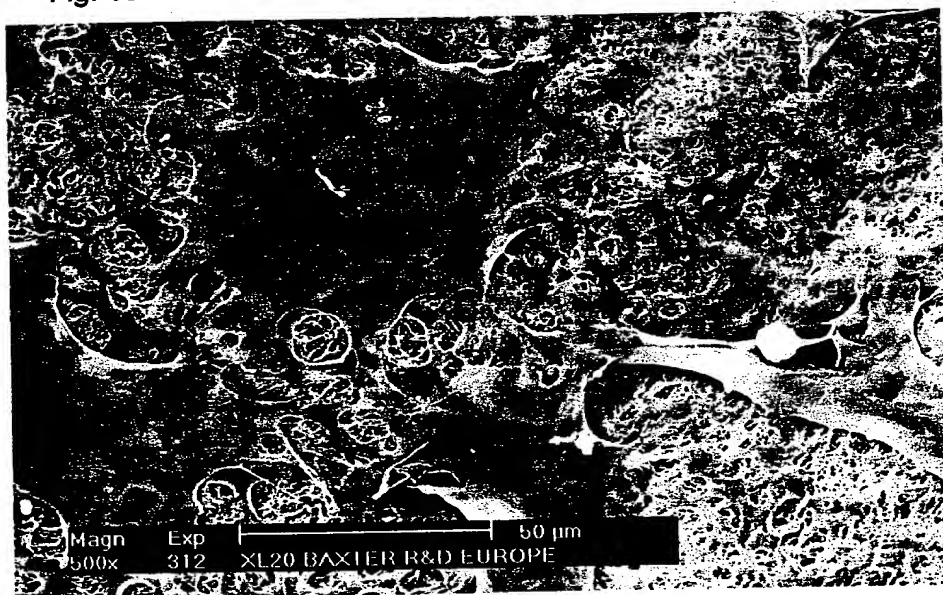


Fig.19

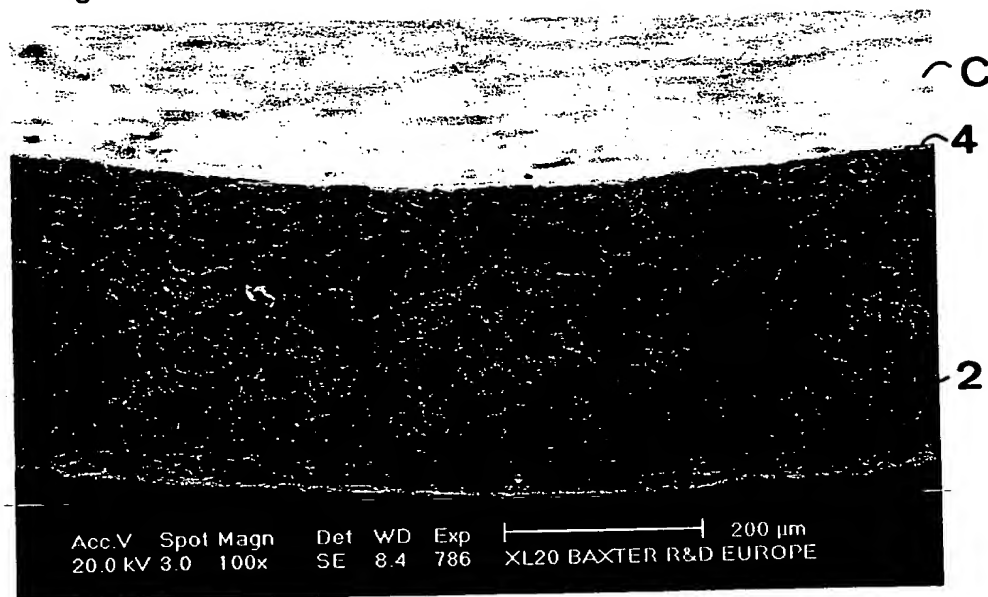
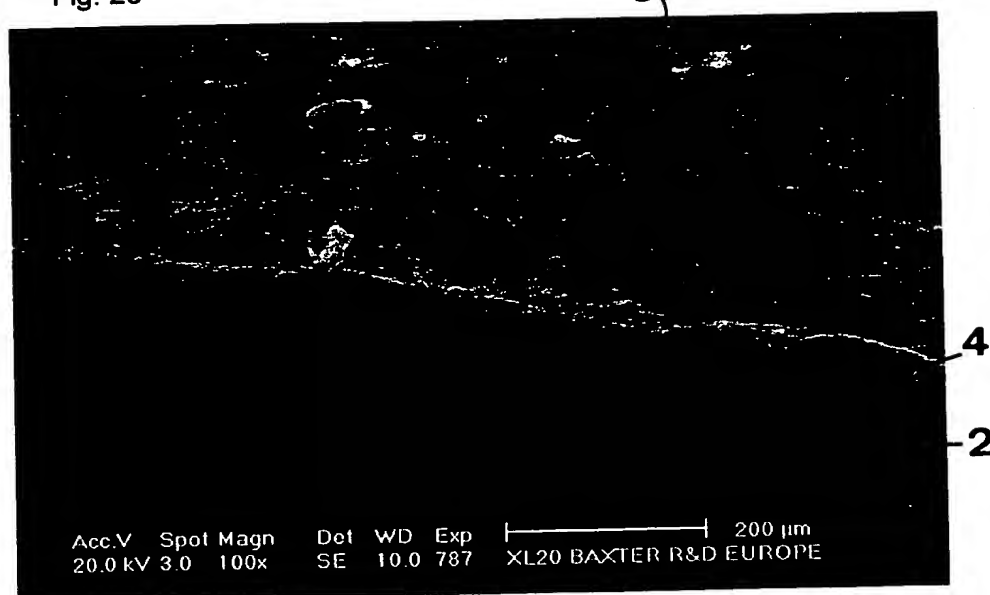


Fig. 20



54

Fig.21

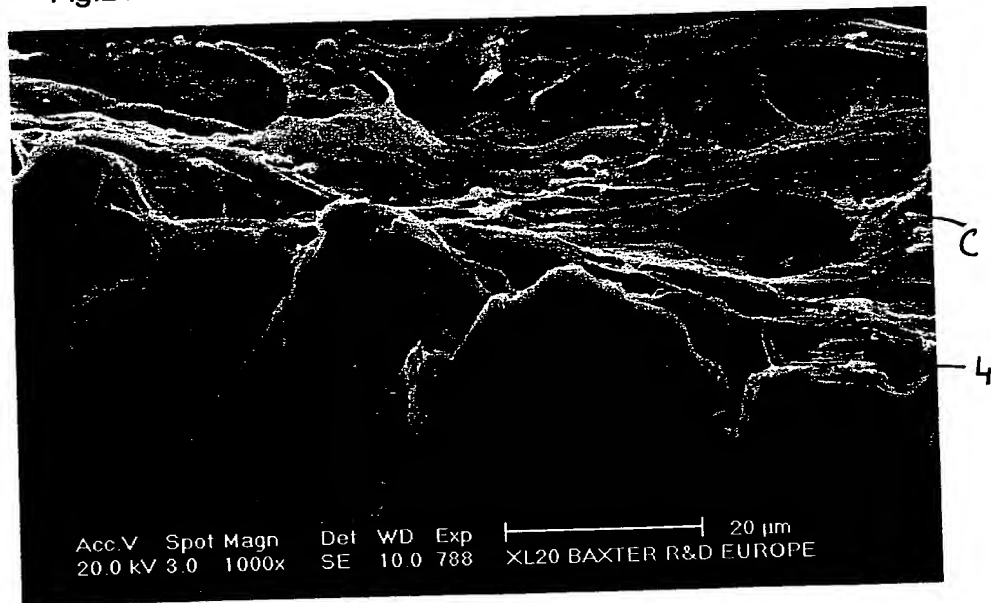


FIG 22

